

**Expression von Sex Hormone-Binding Globulin (SHBG) im Kleinhirn der
Ratte während der Postnatalentwicklung**

Dissertation

**zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)**

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Kristin Piontek
geboren am 16.12.1986 in Karl-Marx-Stadt

Erster Gutachter:

Zweiter Gutachter:

Dritter Gutachter:

Tag der öffentlichen Verteidigung:

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------------------|--|
| ABP | Androgen-Binding-Protein (Androgen-bindendes Protein) |
| AK | Antikörper |
| APES | 3-Aminopropyltriethoxysilan |
| BDNF | brain derived neurotrophic factor |
| CBG | Corticosteroid-Binding-Globulin (Corticotropin-bindendes Globulin) |
| d | Tag |
| DAB | Diaminobenzidin |
| DDSA | Dodecenyl Succinic Anhydride (Dodecenylbernsteinsäureanhydrid) |
| DHEA | Dehydroepiandrosteron |
| DMP 30 | 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)-phenol |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EPON 812 | 1,2,3-Propanetriol-Glycidether |
| GABA | Gamma-aminobutyric acid (Gamma-Amino-Buttersäure) |
| H ₂ O | Wasser |
| H ₂ O ₂ | Wasserstoffperoxid |
| HCl | Salzsäure |
| IgG | Immunglobulin G |
| M | Mol |
| MNA | Methylnacidanhydrid |
| ml | Milliliter |
| NGF | Nerve Growth Factor |
| PAP | Peroxidase-Anti-Peroxidase Komplex |
| PBS | Phosphate Buffered Saline (Phosphatpuffer) |
| SHBG | sex hormone-binding globulin (Sexualhormon-bindendes Globulin) |
| PNT | Postnataltag |
| TBS | Tris Buffered Saline |
| ZNS | zentrales Nervensystem |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Zusammenfassung | 1 |
| 2 | Einleitung | 4 |
| 2.1 | Funktion des Kleinhirns..... | |
| 2.1.1 | Makroskopischer Aufbau des Kleinhirns | 4 |
| 2.1.2 | Mikroskopische Anatomie der Kleinhirnrinde | 7 |
| 2.1.3 | Neuronale Verschaltungen des Kleinhirns | 9 |
| 2.2 | Entwicklung des Kleinhirns..... | |
| 2.2.1 | Allgemeine Entwicklung des Kleinhirns | 11 |
| 2.2.2 | Zelluläre Entwicklung des Kleinhirns | 11 |
| 2.3 | Steroidhormone und Bindungsproteine | |
| 2.3.1 | Steroidhormone | 13 |
| 2.3.2 | Sex Hormone-Binding-Globulin (SHBG) | 14 |
| 2.4 | Zielsetzung..... | 16 |
| 3 | Material und Methoden | 17 |
| 3.0 | Chemikalien und Geräte | 17 |
| 3.0.1 | Chemikalien und Verbrauchsmaterialien..... | 17 |
| 3.0.2 | Geräte | 18 |
| 3.0.3 | Lösungen und Puffer | 19 |
| 3.0.4 | Antikörper | 21 |
| 3.1 | Gewebebegewinnung | 21 |
| 3.1.1 | Versuchstiere und Narkose | 21 |
| 3.1.2 | Gewebebegewinnung..... | 22 |
| 3.2 | Einbettung in Kunstharz und Herstellung von Semi-Dünnschnitten..... | 22 |
| 3.2.1 | Einbettung in EPON 812 | 22 |
| 3.2.2 | Herstellung von Semi-Dünnschnitten | 23 |
| 3.2.2.1 | Beschichtung der Objektträger mit APES | 23 |
| 3.2.2.2 | Semi-Dünnschnitte | 24 |

| | | |
|-------|---|-----------|
| 3.3 | Immunhistochemische Methoden..... | 25 |
| 3.3.1 | Entharzen der Schnitte | 25 |
| 3.3.2 | Blockierung der endogenen Peroxidase | 25 |
| 3.3.3 | Aufbringen von Antikörpern | 25 |
| 3.3.4 | Färbung | 25 |
| 3.3.5 | Entwässern der Schnitte..... | 26 |
| 3.3.6 | Kontrollfärbung | 26 |
| 3.4 | Mikroskopische Auswertung und Dokumentation | 26 |
| 4 | Ergebnisse | 27 |
| 5 | Diskussion..... | 38 |
| 6 | Schlussfolgerungen | 48 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 50 |
| 8 | Abbildungsverzeichnis | 61 |
| 9 | Lebenslauf | 63 |
| 10 | Ehrenwörtliche Erklärung | 64 |
| 11 | Danksagung..... | 65 |

Sex Hormone-Binding Globulin (SHBG) ist ein homodimeres Glykoprotein, welches Sexualhormone wie Testosteron und Östrogen im Blutkreislauf mit hoher Affinität bindet, transportiert und deren Bioverfügbarkeit reguliert. Es wird hauptsächlich in der Leber synthetisiert und sezerniert, wurde aber auch in zahlreichen hormonsensiblen Geweben wie Uterus und Plazenta sowie in diversen Gehirnnarealen nachgewiesen. Vor allem seine Funktionen innerhalb des zentralen Nervensystems (ZNS) sind nicht vollständig geklärt. Es wird aber vermutet, dass SHBG aufgrund seiner umfangreichen Projektionsareale und seiner Expression während kritischer cerebellärer Entwicklungsstadien ein wichtiger Modulator neuronaler Funktionen und Regelkreise darstellt und die Differenzierung und Ausreifung diverser Neuronenarten beeinflusst.

Ziel dieser Arbeit war es, mittels immunzytochemischer Methoden die Lokalisation von SHBG der Kleinhirnrinde der Ratte in einem Zeitraum vom 1. bis 32. postnatalen Entwicklungstag zu untersuchen. Die vorliegende Arbeit ist die erste morphologisch-deskriptive Lokalisationsstudie von SHBG im Cerebellum der Ratte während der Postnatalentwicklung.

Es wurden die morphologischen Veränderungen der Kleinhirnanatomie während des postnatalen Reifeprozesses anhand von mit Toluidinblau gefärbten Übersichtsschnitten dargestellt sowie eine Übersicht über die Topografie und die Verteilung von SHBG in kortikalen cerebellären Neuronen gegeben.

Für die immunzytochemischen Untersuchungen wurden Semi-Dünnschnitte von Rattenkleinhirnen angefertigt und hochspezifische monoklonale Antikörper sowie eine Immunoperoxidase-Methode zum Nachweis von SHBG verwendet. Die Ergebnisse wurden fotografisch und tabellarisch dokumentiert und ausgewertet.

Spezifische Immunreaktivität für SHBG wurde während der postnatalen Entwicklung durchgängig bis zum 32. Tag in zahlreichen Neuronentypen des Cerebellums nachgewiesen, wobei deren Verteilung starken Schwankungen unterworfen war. Besonders hohe Aktivitäten zeigten sich während der ersten Entwicklungswoche im Bereich der Purkinjezellen und der Körnerzellen um den 7. Postnataltag. Die spezifische Färbung der Purkinjezellen war mit

Beginn der zweiten Postnatalwoche rückläufig, wohingegen Körnerzellen und Interneurone mit Einsetzen der Pubertät um die dritte Entwicklungswoche stärker auf SHBG angefärbt waren als vorher. Purkinjezellendriten und Interneurone waren während des untersuchten Zeitraumes gleichmäßig SHBG positiv.

Die deutlich ausgeprägten Immunreaktivitäten in den ersten Tagen nach der Geburt mit ihrem Maximum am 7. PNT, deuten auf Funktionen als Transportprotein, trophischer Faktor und als Puffer für erhöhte Sexualhormonspiegel hin. Das Kleinhirn zeigt in der frühen Postnatalzeit eine hohe Steroidsensitivität, d. h., dendritisches und axonales Wachstum scheint maßgeblich von Steroidhormonen beeinflusst zu werden. Erhöhte Immunreaktivitäten im Bereich des 20. Entwicklungstages lassen einen Zusammenhang mit erhöhten Geschlechtshormonspiegeln mit Beginn der Pubertät und dem Verlassen des Nestes vermuten. Gleichbleibend moderat hohe SHBG Spiegel in den letzten untersuchten Entwicklungstagen unterstützen die Bedeutung von SHBG als essentieller Faktor für die vollständige motorische Entwicklung und eine abgeschlossene Synaptogenese. Die deutliche Expression von SHBG während des untersuchten Zeitraumes und die unterschiedliche Lokalisation und biologische Aktivität in cerebellären Neuronen unterstreicht bereits bestehende Vermutungen über eine Wirkweise nicht nur als Transportprotein, sondern auch als Neurotransmitter und sogar als neurotropher Faktor. Die an einigen Tagen beobachteten positiven Immunreaktivitäten im Bereich der Zellkerne bestätigen auch die Annahme, SHBG transportiere Steroidhormone aktiv in den Zellkern. Die bis dato u. a. nachgewiesenen Funktionen als Steroidtransporter im Blutkreislauf, der Regulation der Synthese von intrazellulären Steroidhormonrezeptoren, die wahrscheinliche Beteiligung an einer nicht-genomischen, schnellen Wirkweise von Steroidhormonen und seine Bedeutung als Modulator neuronaler Regelkreise im Sinne eines trophischen Faktors werden von unseren Ergebnissen bestätigt.

Von besonderem Interesse für einen etwaigen klinischen Einsatz wäre die Anwendung im Bereich neurodegenerativer und alters-assoziierter Erkrankungen sowie im Bereich der Tumorthherapie und bei Stoffwechselleiden. SHBG könnte als trophischer Faktor die neuronale Proliferation positiv beeinflussen und z. B. auch im Bereich der Krebstherapie östrogen-sensitiver Tumoren Bedeutung gewinnen. Auch bei der Behandlung von Diabetes, Alzheimer oder Osteoporose könnten Sexualhormone und evtl. auch künstlich erzeugte Alternativen eine wichtige Rolle spielen.

Die Bedeutung von SHBG im Organismus ist weitreichend und komplex und bedarf weiterer Untersuchungen, um seine komplizierten Wirkgefüge endgültig verstehen und aufzeigen zu können.

2 Einleitung

2 Einleitung

2.1 Funktion des Kleinhirns

Das Kleinhirn (Cerebellum) koordiniert hauptsächlich den Ablauf von Gang und Bewegungen und ist sowohl für Balance und Körperhaltung als auch für die Sprache und die Kontrolle der Blickmotorik verantwortlich (Schmahmann et al. 1997). Seine Aufgaben liegen weiterhin im Regeln des Muskeltonus über Muskelspindeln, der Kontrolle der Stützmotorik sowie der zeitlichen Koordination von Bewegungen. Ausfallerscheinungen werden so als Koordinationsstörungen (cerebelläre Ataxie), Blickstabilisierungsstörungen und verminderter Muskeltonus deutlich (Lippert 2000). Weiterhin spielt es eine Schlüsselrolle beim Erlernen motorischer Abläufe sowie bei verschiedenen Lernvorgängen wie dem impliziten Lernen. Es ist damit u. a. für das prozedurale Gedächtnis wichtig. Heutzutage wird das Kleinhirn auch eng mit der Wahrnehmung, mit komplexen kognitiven Funktionen und sogar mit der Entstehung von Emotionen assoziiert (Ito et al. 2006). Neueste Untersuchungen deuteten auch auf eine Schlüsselrolle bei der zeitlichen Regulierung nicht-motorischer Funktionen, Wortfindungsfunktionen und sensorischer Diskriminationsfähigkeiten hin (Barinaga 1996).

2.1.1 Makroskopischer Aufbau des Kleinhirns

Das Cerebellum liegt in der hinteren Schädelgrube und sitzt sowohl dem Hirnstamm als auch der Brücke von dorsal auf (Trepel 2004). Sein größter Durchmesser beträgt ca. 10 cm und es wiegt 130-140 g (1/10 der gesamten Gehirnmasse) (Lippert 2000). Mit drei Stielen, dem *Pedunculus cerebellaris superior*, dem *Pedunculus cerebellaris medius* und dem *Pedunculus cerebellaris inferior* steht das Kleinhirn afferent und efferent mit dem Hirnstamm in Verbindung.

Vom Cerebellum aus ziehen die beiden Kleinhirnsiegel (*Velum medullare superius* und *inferius*) zum Rückenmark und zum Mesenzephalon und bilden außerdem das Dach des 4. Ventrikels. Vom Großhirn ist das Cerebellum durch das *Tentorium cerebelli*, einer Duraduplikatur, getrennt (Trepel 2004).

Im Gegensatz zum Oberflächenrelief des Großhirns ist die Oberflächenstruktur des Kleinhirns viel feiner: Die an der Oberfläche verlaufenden Furchen werden wegen ihres parallelen Verlaufs und der starken Auffaltung der Kleinhirnwindungen als *Foliae cerebelli*, ("Kleinhirnblätter") bezeichnet (Lippert 2000). Die im Querschnitt sichtbare Ähnlichkeit der *Foliae cerebelli* mit einem Baum führte auch zur Bezeichnung *Arbor vitae* (Lebensbaum) (Schünke et al. 2006).

Von außen betrachtet ist außerdem eine Aufteilung in zwei seitliche ausladende *Hemispheriae cerebelli* (Kleinhirnhemisphären) mit dem dazwischen liegenden, unpaaren *Vermis cerebelli* (Wurm) erkennbar. Kaudal des *Vermis* liegt der *Flocculus*, welcher über den unteren Teil des *Vermis* mit dem *Nodulus* verbunden ist. Beide Strukturen zusammen tragen den Namen *Lobus flocculonodularis*. Am weitesten kaudal findet man die Kleinhirntonsillen, die eine enge Nachbarschaft zum *Foramen magnum* und zur *Medulla oblongata* besitzen (Trepel 2004).

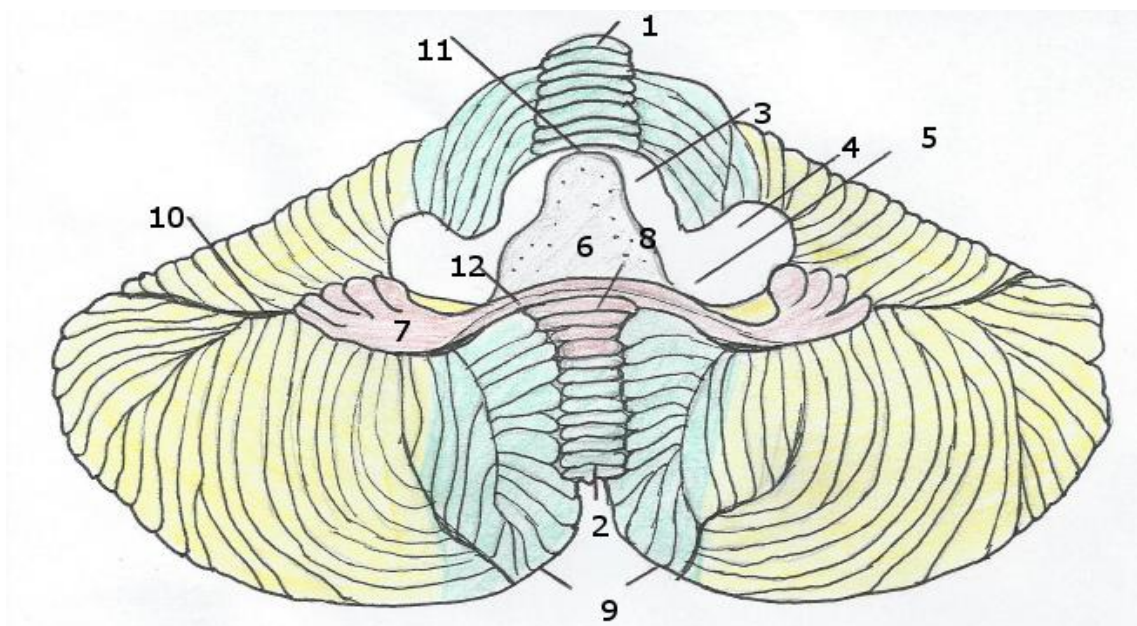


Abb. 01 Außenansicht des Kleinhirns des Menschen
(Quelle: geändert nach Trepel 2004)

| | | | |
|---|----------------------------------|----|--------------------------|
| 1 | Culmen (Teil des Vermis) | 7 | Flocculus |
| 2 | Tuber (Teil des Vermis) | 8 | Nodulus |
| 3 | Pedunculus cerebellaris superior | 9 | Tonsillae cerebelli |
| 4 | Pedunculus cerebellaris medius | 10 | Fissura posterolateralis |
| 5 | Pedunculus cerebellaris inferior | 11 | Velum medullare superius |
| 6 | Dach 4. Ventrikel | 12 | Velum medullare inferius |

Aufgrund anatomischer, funktioneller und phylogenetischer Gesichtspunkte kann das Kleinhirn in verschiedene Bereiche unterteilt werden.

Im Querschnitt durch das Kleinhirn ist im Inneren das Marklager, die weiße Substanz und nach außen verlaufend die graue Substanz, der *Cortex cerebelli* (Kleinhirnrinde) erkennbar. In der Tiefe des Marklagers befinden sich die efferenten Neurone des Kleinhirns enthaltenen *Nuclei* (Kernpaare):

- *Nucleus fastigii* (steht mit dem *Lobus flocculonodularis* und damit dem *Vestibulocerebellum* in Verbindung)
- *Nucleus dentatus* (größter Kern, lokalisiert im Bereich der Hemisphären, funktionell mit dem *Pontocerebellum* verbunden)
- *Nucleus emboliformis* (Verbindung mit den spinocerebellären Bereichen des *Cerebellums*)
- *Nuclei globosi* (enge funktionelle Verbindung mit *Ncl. emboliformis*)

Funktionell gliedert es sich folgendermaßen:

- *Vestibulocerebellum*: bestehend aus *Lobulus* und *Flocculus* = *Lobus flocculonodularis*. Es steht eng in Beziehung zum Vestibularorgan des Innenohrs, erhält von dort auch seine Afferenzen und ist für die Gleichgewichtsmotorik zuständig.
- *Spinocerebellum*: Umfasst den Hauptteil des *Vermis* sowie *paravermale* Bereiche. Afferenzen entstammen der *Medulla oblongata* und den spinozerebellären Bahnen. Es dient der Koordination von Halte- und Stützmotorik.
- *Pontocerebellum*: Umfasst größtenteils die beiden Kleinhirnhemisphären. Eingehende Informationen kommen aus dem motorischen und prämotorischen Kortex des Endhirns. Sein Zuständigkeitsbereich umfasst die Feinmotorik von Bewegungsabläufen (Welsch 2006).

Die phylogenetische Einteilung erfolgt in das *Archicerebellum* (Urkleinhirn), das *Paleocerebellum* (Altkleinhirn) und das *Neocerebellum* (Neukleinhirn) (Lippert 2000).

2.1.2 Mikroskopische Anatomie der Kleinhirnrinde

Um seine diversen komplexen motorischen Funktionen ausführen zu können, enthält das Cerebellum mehr als 50% aller Neurone des gesamten Gehirns, obwohl es nur einen geringen Teil seines Gesamtgewichts ausmacht (Schünke 2006). Die meisten dieser Neurone (bis zu 20^{10}) liegen in der nervenzellreichen Kleinhirnrinde (Welsch 2006). Mikroskopisch besteht der *Cortex cerebelli* aus vier unterschiedlichen Neuronentypen: Körnerzellen, Purkinjezellen und zwei Arten von inhibitorischen Interneuronen, den Golgizellen und den Korb-/Sternzellen (Voogd und Glickstein 1998).

Die *mikroskopische Einteilung* der ca. 1 mm starken Kleinhirnrinde gliedert sich von außen nach innen folgendermaßen:

- 1 Stratum moleculare (faserreich, wenig Neurone)
- 2 Stratum purkinjense / ganglionare
- 3 Stratum granulosum (zahlreiche Körnerzellen)

Der Körnerzellschicht schließt sich nach innen die *Medulla* (Marklager) an. Die faserreiche, neuronienarme **Molekularschicht** (300-400 μm) ist die äußerste Schicht des Cortex und besteht aus zahlreichen Nervenfasern. Hauptsächlich handelt es sich um Parallelfasern, Kletterfasern und Dendriten von Purkinjezellen. Weiterhin kommen hier Stern- und Korbzellen sowie Gliazellen vor. Erstere gehören zu den inhibitorischen Interneuronen, die durch Glutamat von den Axonen der Körnerzellen erregt werden. Sie selbst wirken jedoch über die Ausschüttung von GABA hemmend an ihren Synapsen (Trepel 2004). Die Sternzellen erreichen die Dendritenbäume der Purkinjezellen, welche sich bis zur Oberfläche der Molekularschicht erstrecken, wohingegen die Korbzellen die Perikarya der Purkinjezellen mit ihren Axonen erreichen (Welsch 2006).

Auch die Bergmann-Gliazellen (radiär angeordnete Astrozyten), Mikrogliazellen und Oligodendrozyten sind in der Rinde anzutreffen. Die Äste der großen Bergmann-Gliazellen durchziehen die gesamte Molekularschicht, vereinigen sich an der Oberfläche und bilden dort die Gliagrenzmembran (Standring 2004).

Die **Purkinjezellschicht** (Stratum purkinjense) liegt typischerweise an der Grenze zwischen Molekular- und Körnerschicht. In ihr liegen die größten und wichtigsten Zellen des

Kleinhirns, die 30 µm großen, birnenförmigen Purkinjezellen (Welsch 2006). Interneurone, wie Korbzellen und Golgi-Zellen, mischen sich unter die Perykarya der Purkinjezellen (Standring 2004). Purkinjezellen sind GABAerge Neuronen, die als einzige Zellen des Cortex efferent sind und in die Kleinhirnerne projizieren. Purkinjezellen werden sowohl durch erregende Parallel- und Kletterfasern als auch durch inhibierende Stern-, Korb- und Golgizellen beeinflusst und interagieren eng mit Bergmann-Gliazellen (Bellamy et al. 2006). Purkinjezellen erhalten erregende Synapsen v. a. von den Moosfasern.

In adulten Säugetieren hat eine einzige Moosfaser Kontakt mit einigen hundert Körnerzellen, die wiederum Parallelfasern ausbilden. Die Parallelfasern steigen in die Molekularschicht auf, teilen sich und bilden Synapsen mit Purkinjezellen. Jede Purkinjezelle erhält Input von bis zu 80.000 Parallelfasern. Weitere exzitatorische Afferenzen erhalten sie von den Kletterfasern (Konnerth et al. 1990).

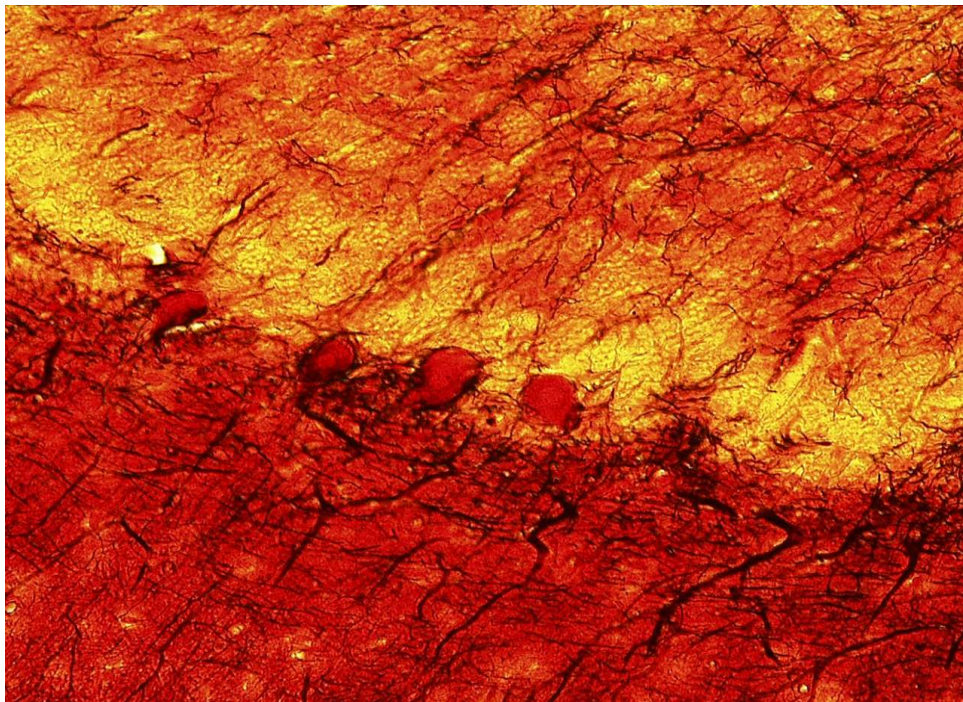


Abb. 02 Kleinhirnrinde, Silberfärbung

Sich dem Mark anschließend folgt die **Körnerzellschicht** (*Stratum granulosum*), welche als zellreichste Schicht der Kleinhirnrinde über 99% aller kortikalen Neurone beinhaltet und mit den kleinen, multipolaren Körnerzellen die einzigen erregenden Neurone der Kleinhirnrinde

besitzt. Die Körnerzellschicht ist in den Fissuren 100 µm und im Bereich der Foliae 400-500 µm dick. Die Körnerzellen sind kleine, glutaminerge Neuronen (Voogd et al. 1998). Mit einer Anzahl von 6 Mio./mm² stellen sie die zahlreichsten Neurone des gesamten Gehirns dar (Bower et al. 2003). Die Moosfasern enden in der Körnerschicht, Kletterfasern und Axone der Purkinjezellen durchziehen sie. Die Axone der Körnerzellen laufen bis in die Molekularschicht, wo sie sich verzweigen und in Parallelfasern aufteilen. Weiterhin findet man in der Körnerschicht einzelne Golgizellen, die ein negatives Rückkopplungssystem für die Körnerzellen darstellen und so den Moosfasereingang modulieren (Welsch 2006).

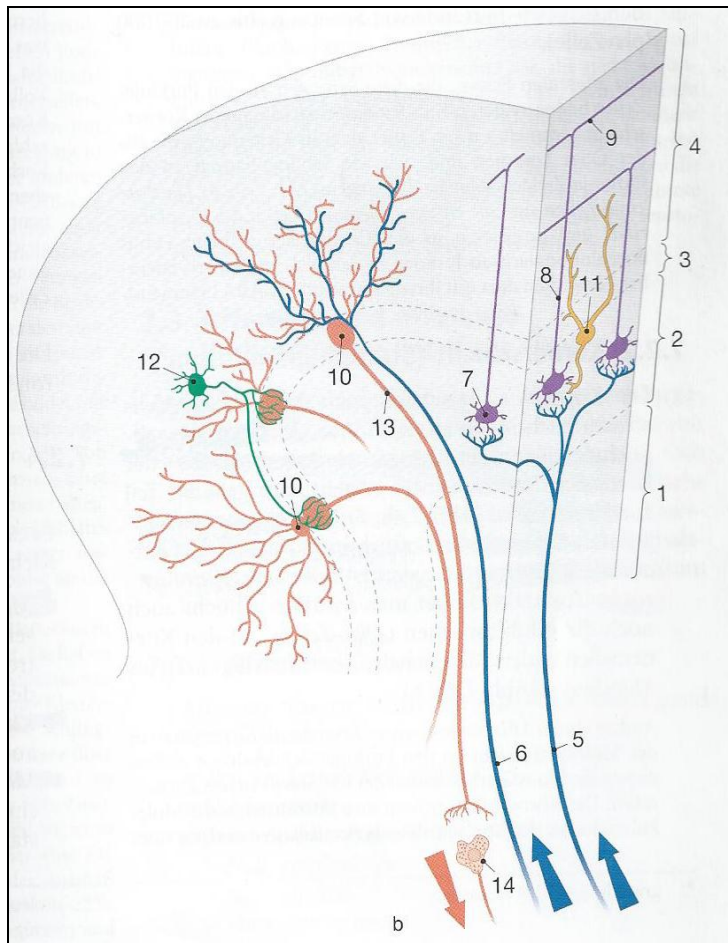
Im **Marklager**, das sich der Körnerschicht anschließt, liegen die Kleinhirnkerne, welche von Purkinjezell-Axonon gehemmt werden und von den Axonen der Moos- und Kletterfasern Kollateralen erhalten.

2.1.3 Neuronale Verschaltungen des Kleinhirns

Afferenzen ziehen im Kleinhirn grundsätzlich unter Abgabe von Kollateralen zu den Kleinhirnkernen und zum Cortex, wohingegen die efferenten Fasern von den Kleinhirnkernen ausgehend zum Mittelhirn, Thalamus und zum Hirnstamm projizieren. Im Bereich der Kleinhirnrinde werden über die Purkinjezellen eingehende Informationen registriert und an die Kerne weitergeleitet, welche dann ihrerseits in nachgeschaltete Zentren projizieren (Trepel 2004).

Man unterscheidet drei Arten extracerebellärer Afferenzen:

- 1 Moosfaserafferenzen
- 2 Kletterfasern
- 3 diffus organisierte mono-aminerge und cholinerge Afferenzen
(Voogd und Glickstein 1998)



- 1 Marklager
- 2 Stratum granulosum
- 3 Stratum purkinjense
- 4 Stratum moleculare
- 5 Moosfasern
- 6 Kletterfasern
- 7 Körnerzellen
- 8 Axone
- 9 Parallelfasern
- 10 Purkinje Zelle
- 11 Golgi-Zellen
- 12 Korbzellen
- 13 efferente Axone
- 14 Neuronen der Kleinhirnerne

Quelle: Trepel, Neuroanatomie, 3. Auflage, 2004

Abb. 03 Aufbau des Cortex mit Afferenzen, Efferenzen und Neuronentypen

Die Moosfaserafferenzen nehmen ihren Ausgang von verschiedenen dem Kleinhirn vorgeschalteten Zentren, wie dem Rückenmark, den Ncll. pontis und den Ncll. vestibulares, während die Afferenzen der Kletterfasern einzig aus dem Olivenkernkomplex im Bereich der Medulla oblongata entstammen. Die selteneren monoaminergen Afferenzen entstammen Kernen der Formatio reticularis. Fast alle Efferenzen des Kleinhirns ziehen über den Pedunculus cerebellaris superior, kreuzen nach kontralateral und ziehen in Projektionsgebiete wie den Thalamus, Ncl. ruber, Ncll. vestibulares und die Formatio reticularis (Trepel 2004). Zwar senden sie exzitatorische Impulse nach peripher, die inhibitorischen Purkinjezellen können jedoch die Informationen aus den Kleinhirnkernen gezielt hemmen, was wiederum einen regelrechten Bewegungsablauf zur Folge hat (Schünke 2006).

2.2 Entwicklung des Kleinhirns

2.2.1 Allgemeine Entwicklung des Kleinhirns

Das Kleinhirn gehört zu den Hirnstrukturen, welche sich frühzeitig differenzieren, aber auch zu denen, die erst relativ spät ausreifen. Die zelluläre Organisation des Kleinhirns ist daher beim Menschen noch viele Monate nach der Geburt großen Veränderungen unterworfen (Wang et al. 2001). Das Cerebellum entwickelt sich primär aus der Rautenlippe, dem hinteren Teil der Flügelplatte des Metencephalons (Goldowitz et al. 1998). Es entstehen zunächst zwei rundliche Verdickungen, die teilweise in den vierten Ventrikel hineinragen und somit die rudimentären Kleinhirnhemisphären formen. Der rostrale Teil vom Dach des Metencephalons wird von Zellen aus der Flügelplatte besiedelt und bildet so die Anlagen des Vermis. Zu einem späteren Zeitpunkt stülpt sich die Kleinhirnanlage um, woraufhin das Cerebellum nun aus einer zweilappigen Verdickung besteht, die sich über den rostralen Teil des vierten Ventrikels ausdehnt. Während des 20.-21. Entwicklungstages erscheinen auf der hinteren Seite der Kleinhirnrudimente als Vorläufer der späteren Kleinhirnfurchen einige Vertiefungen (Altman und Bayer 1997). Der rechte und linke Anteil der primär entstehenden Fissur treffen sich nachher in der Mitte, wo sie die Abgrenzung zwischen dem untersten Lappen des Vermis, des Nodus und dem Rest des Wurmes formen. Der Lobulus flocculonodularis kann zu diesem Zeitpunkt als die kaudalste Kleinhirnunterteilung gesehen werden und dient als Befestigung des epithelialen Daches des vierten Ventrikels. Später gliedert sich das Cerebellum durch die Fissura prima in einen Lobus anterior und einen Lobus posterior. Gleichzeitig erscheinen zwei kurze quer verlaufende Furchen am kaudalen Vermis, welche die rostrale Grenze der Uvula darstellen und die Pyramide abgrenzen. Das Kleinhirn wächst nun sowohl in dorsale und rostrale als auch in kaudale und laterale Richtung, während die Hemisphären sich viel weiter als der inferiore Teil des Wurmes ausdehnen. Es entstehen weitere Fissuren, sodass es zu einer beträchtlichen Oberflächenvergrößerung der Kleinhirnrinde kommt. Im Laufe der Entwicklung wird das Cerebellum das Dach des IV. Ventrikels vollständig bedecken (Standring 2004).

2.2.2 Zelluläre Entwicklung des Kleinhirns

Während in der Großhirnrinde Neuroblasten aus der ventrikulären Zone abstammen und ventriculofugal zur pialen Oberfläche auswandern, wandert während der Kleinhirnentwicklung frühzeitig eine Schicht von Zellen aus, die ausschließlich von der

Rautenlippe des Metencephalons abstammt. Diese Zellen formen die äußere Keimschicht und in der späteren Entwicklung werden ihre Abkömmlinge ins Kleinhirn abwandern. Demnach hat das Cerebellum während seines Wachstums einen intraventrikulären (Zellen, die sich aus dem ventrikulären Bereich ausbreiten) und einem extraventrikulären Anteil (Zellen, die von der externen Keimschicht kommen). Die frühe bilaterale Ausdehnung der ventrikulären Oberfläche spiegelt die Bildung von Neuroblasten, Kleinhirnkernen und efferenten Neuronen der Kleinhirnrinde wieder. Die sternförmigen Gliazellen spielen beim Begleiten der Purkinjezellen zur meningealen Oberfläche der cerebellären Anlage eine Rolle. Während dieses frühen Stadiums der Kleinhirnentwicklung, welches von der Entstehung und dem Auswandern von efferenten cerebellären Neuronen geprägt ist, bleibt die Oberfläche der Kleinhirnanlage weich (Standring 2004). Mit Beginn der dritten Entwicklungswoche breitet sich die Körnerzellschicht über die Oberfläche des Kleinhirns aus (Altman und Bayer 1978). Die Extroversion des Kleinhirns beginnt später, wenn Zellen der äußeren Körnerschicht proliferieren und auszuwandern beginnen. Diese Zellen produzieren die Körnerzellen, welche entlang der Gliazellen nach innen wandern und sich dann in der Körnerschicht ansiedeln. Proliferation und Auswanderung von Körnerzellen führt zu einer großen kaudalen Vergrößerung der meningealen Kleinhirnoberfläche, indem die Querfissuren entstehen und die mehrschichtige Purkinjezellschicht einschichtig wird. Purkinjezellen werden vor den Körnerzellen gebildet, welche den Empfänger des primären afferenten Systems des Kleinhirns, der Moosfasern, darstellen (Standring 2004). Die Purkinjezellen beginnen am 17. pränatalen Entwicklungstag zu migrieren und siedeln sich am 17. Tag im posterioren Vermis an, erreichen ihren definitiven Zielort aber erst am 22.Tag. (Altman und Bayer 1985). Die Pyramidenzellen wiederum entstammen dem Neuroepithel der kortikalen ventrikulären Zone, wohingegen die nicht-pyramidalen Zellen zum größten Teil dem ventralen Anteil des Telencephalons entspringen (Parnavelas 2000). Der Entwicklung der efferenten Neurone der Kleinhirnrinde und der Kerne geht die Entwicklung ihrer afferenten Gliederung voraus. Die frühe bilaterale Kleinhirnanlage wandelt sich zu diesem Zeitpunkt durch die Fusion der bilateralen intraventrikulären Verdickungen und dem Verschwinden des Ependyms, dem Zusammenwachsen der primitiven rechten und linken Rinde und der Entwicklung der Commisura cerebellaris durch Einwachsen afferenter Fasern und dem Wachstum efferenter Axone des medialen Kleinhirnkerns zu einer einheitlichen Struktur. Wenn die externe Keimschicht anfänglich gebildet wird, ist die vielzellige Purkinjezellschicht nicht einheitlich, sondern in Ansammlungen unterteilt. Die medialen Purkinjezellgruppierungen entwickeln sich zum zukünftigen Vermis. Diese Purkinjezellen werden Axone ausbilden, die mit

Neuronen im Nucleus vestibularis und Nucleus fastigii verschaltet werden. Die lateralen Ansammlungen gehören zu den zukünftigen Hemisphären und bilden Axone, die in zwischengeschalteten Kernen und im Nucleus dentatus enden. Die scharfe Grenze der efferenten Projektionen des Vermis und der Hemisphären ist demzufolge bereits frühzeitig festgelegt. Diese Gruppierungen führen zur Entstehung von Purkinjezellbereichen im adulten Cerebellum, die zu einem einzelnen vestibulären Kern oder Kleinhirnkern projizieren (Standring 2004). Zum Zeitpunkt der Geburt ist die Ausreifung tiefer nukleärer Neurone fast vollständig abgeschlossen, während die Reifung der pränatal gebildeten Neurone erst nach der Geburt mit der Bildung neuer Neurone im Bereich der externen Keimschicht beginnt (Altman und Bayer 1978). Die Kleinhirnentwicklung der Ratte verläuft analog, allerdings ist sie bereits in der 6. Postnatalwoche weitgehend abgeschlossen (Altman und Bayer 1997).

2.3 Steroidhormone

Steroidhormone (Glucocorticoide, Mineralcorticoide und Sexualhormone) sind kleine lipophile Moleküle, die aufgrund dieser Eigenschaft die Blut-Hirn-Schranke passieren können. Sie wirken über klassische intrazelluläre, spezifische Kernrezeptoren, die als Transkriptionsfaktoren die Proteinsynthese steuern können (Beato et al. 1996). Im Blut werden Steroidhormone aufgrund ihrer Lipophilität an verschiedene Transportproteine (wie SHBG, ABP) gebunden, die so einen wichtigen Einfluss auf die biologische Verfügbarkeit des Steroidhormons haben, da jeweils nur das freie Hormon biologisch wirksam ist (Becchis et al. 1996, Königshoff 2004). Ihr lipophiler Charakter ermöglicht es diesen Hormonen somit auch, Zellmembranen zu durchdringen und intrazellulär aktive Hormon-Rezeptor-Komplexe zu bilden, die an DNA-Sequenzen im Zellkern binden und direkt Einfluss auf die Transkription verschiedener Proteine etc. nehmen können (Adams 2005). Der Abbau von Steroidhormonen erfolgt in der Leber mittels Biotransformation, wo die apolaren Hormone mit reaktiven Substanzen gekoppelt und mit hydrophilen Substanzen konjugiert werden (Rassow 2006). Sexualhormone spielen außerdem eine Schlüsselrolle bei der Regulation von Fruchtbarkeit, Reproduktion und dem Sexualverhalten (Grishkovskaya et al. 2000). Sie üben ihre Funktion an der Zelloberfläche durch eine Vielzahl wenig definierter nicht-genomischer Mechanismen und über spezifische Kernrezeptorproteine aus, welche als Transkriptionsfaktoren fungieren (Revelli et al. 1998). Jedoch konnten neben den bekannten genomischen Wirkungen auch vielfache schnelle, nicht genomische Wirkungen über Membranrezeptoren eindeutig gezeigt werden (Falkenstein et al. 2000). Wie Steroidhormone

in Körperzellen gelangen, konnte noch nicht genau erklärt werden. Intrazelluläre Steroidkonzentrationen werden durch die freie Diffusion der Steroide durch die Zellmembran reguliert (Mendel 1992). Jedoch könnten Membranrezeptoren für spezifische Bindungsglobuline wie SHBG die passive Aufnahme des Hormons durch Bindung des SHBG-Steroidkomplexes auf der Zelloberfläche erhöhen (Avvakumov 1991) oder die Internalisierung des gesamten Komplexes begünstigen (Porto et al. 1995). Die morphologischen Veränderungen im Kleinhirn während der Postnatalentwicklung korrelieren mit endogenen Schwankungen des Östrogenspiegels. Vor allem Gehirnregionen wie die Kleinhirnrinde exprimieren während eingeschränkter perinataler Entwicklungsperioden eine große Menge an Estrogenrezeptoren (Friedman et al. 1993, Gerlach et al. 1983).

2.3.2 Sex-Hormone-Binding-Globulin (SHBG)

Sex-Hormone-Binding-Globulin (SHBG) ist ein homodimeres Plasma Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 90-100 kDa, welches sowohl Androgene als auch Östrogene mit hoher Affinität bindet. Ein einzelnes Monomer umfasst eine einsträngige Glykopeptidkette aus 367 Aminosäuren (Griffin et al. 1989). Pro Dimer wird jeweils nur ein Steroidmolekül gebunden (Gershagen et al. 1987). SHBG besitzt zwei Bindungsstellen, eine für das jeweilige Steroid und eine für den spezifischen Membranrezeptor (Rosner et al. 1992). SHBG wird durch ein Gen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17 (17p12-p13) codiert (Bérubé et al. 1990).

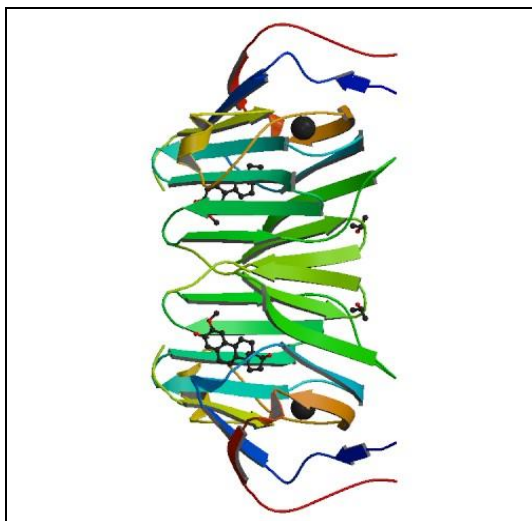


Abb. 04 Proteinstruktur des humanen SHBG

Quelle: Protein Data Bank

<http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1D2S>

Seine Hauptfunktion besteht darin, Steroidhormone im Plasma spezifisch zu binden und zu transportieren (Hammond 1990). Die höchste Bindungsaffinität weist SHBG für Dihydrotestosteron auf, während Testosteron, Östrogen, Dehydroepiandrosteron (DHEA) und Androstendion mit geringerer Affinität gebunden werden. Die Bindung von Sexualhormonen an SHBG ist reversibel (Greenspan 1992). Die biologische Aktivität dieser Hormone wird durch SHBG reguliert, es beeinflusst so den Zugang zu den Zielzellen und reguliert folglich deren Konzentration im Blut (Hammond et al. 1987, Rosner 1990, Joseph et al. 1992). Im Plasma vorkommendes SHBG wird primär in den Hepatozyten synthetisiert, sezerniert und an den Blutkreislauf abgegeben (Jänne 1998). Ein Homolog des SHBG, bekannt als Androgen-bindendes-Protein (ABP), wird in den Sertoli-Zellen vieler Säugetiere exprimiert, während die testikuläre Expression des humanen SHBG auf die Keimzellen beschränkt ist (French and Ritzen 1973, Avvakumow et al. 2010). Beide Proteine werden vom selben Gen codiert, haben aber unterschiedliche Synthesorte (Sullivan et al. 1993). Neben der Leber kann SHBG auch in weiteren, vor allem in für Sexualhormon sensiblen Zellen nachgewiesen werden. U. a. kommt es in der Prostata, in Follikelzellen, im Gewebe von Brustdrüsen, Plazenta, Vagina, Endometrium sowie in zahlreichen Zellen des ZNS vor (Kahn et al. 2002, Herbert et al. 2005, Hryb et al. 2002, Strel'chyonok et al. 1984). Es ist wenig über die Expression von SHBG während der fetalen Entwicklung bei Säugetieren bekannt, aber es kann immer dann in fetaler Rattenleber nachgewiesen werden, wenn Sexualhormone die Größe und Entwicklung von Reproduktionsgeweben beeinflussen (Jänne et al. 1990). Über 98% der gonadalen Steroide sind an Proteine wie SHBG gebunden (Pardridge und Mietus 1979). Möglicherweise wirkt SHBG auch über spezifische Membranrezeptoren und G-Protein vermittelter cAMP-Erhöhung (Nakhla et al. 1999). Das geschieht aber nur, wenn seine Bindungsdomänen nicht von einem Liganden besetzt sind (Rosner 1991). Bindungsproteine wie SHBG können im Gegensatz zu Steroidhormonen die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden. Es wurde aber im Hypothalamus von Ratten nachgewiesen, was auf eine intrinsische Produktion im ZNS hinweist (Herbert et al. 2003). Weiterhin kommt es im Liquor cerebrospinalis, in Axonen sowie in neuro-hypophysären Systemen vor. Seine eigentliche Funktion im ZNS ist nicht geklärt, jedoch geben Verhaltensexperimente einen Hinweis darauf, dass SHBG das Sexualverhalten und die Brutpflege von Säugetieren beeinflusst. U. a. konnte nachgewiesen werden, dass SHBG nach Infusion in das mediale präoptische Areal zu einer Steigerung der sexuellen Aktivität führt (Caldwell et al. 2000). Eine Mutation im Bereich des kodierenden Gens mit einhergehenden niedrigen SHBG-Spiegeln führte zu Symptomen wie Hyperandrogenismus und ovarialen Fehlfunktionen (Hogeveen et al. 2002). Bis vor kurzem

wurde generell angenommen, dass die einzige Funktion von Bindungsproteinen wie SHBG in der Regulation der Konzentration von freien Steroiden im Plasma liegen würde, jedoch führten die Hinweise auf spezifische SHBG- und CBG-Rezeptoren in Zellmembranen einer großen Zahl von Geweben zu der Annahme, dass diese Glykoproteine doch andere Rollen spielen könnten. Während der letzten Jahre konnte nachgewiesen werden, dass SHBG spezifisch an die Plasmamembran von Epithelzellen der Prostata und des Endometriums bindet (Hyrb et al. 1990). Auch Wang et al. 1990 wiesen sowohl SHBG mRNA als auch immunreaktives SHBG im adulten Gehirn von Ratten nach, woraufhin man annahm, dass im Gehirn produziertem SHBG dort auch eine funktionelle Bedeutung zukommt.

2.4 Zielsetzung

Ziel der Arbeit ist es, die Expression von Sex Hormone-Binding Globulin mittels immunzytochemischer Methoden im Kleinhirn von Ratten über einen Zeitraum von 32 Tagen während der postnatalen Entwicklung morphologisch-deskriptiv darzustellen. Für die Untersuchungen wurden Semi-Dünnschnitte von in Epoxid-Harz eingebetteten Kleinhirnen angefertigt, welche immunzytochemisch auf SHBG angefärbt und anschließend mikroskopisch ausgewertet wurden. Im Rahmen der Arbeit sollte der Versuch unternommen werden, die Rolle von SHBG sowie von Steroidhormonen im Allgemeinen bei der Entwicklung des Cerebellums der Altersgruppen von Geburt bis zur Pubertät einzuschätzen und zu interpretieren sowie einen Überblick über deren Bedeutung und Funktionsvielfalt zu geben.

3 Material und Methoden

3.0 Chemikalien und Geräte

3.0.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

| | |
|---|---|
| Azeton | Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| APES (3-Aminopropyltriethoxysilan) | F. B. Silbermann GmbH & Co. KG, Gablingen |
| Aqua dest. | Anatomie II, Jena |
| Aqua bidest. | Anatomie II, Jena |
| Benzol | Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| DAB (3,3'-Diaminobenzidin) | Merck KG aA., Darmstadt |
| DDSA (Dodeceny-Bernsteinsäureanhydrid) | Fluka Chemie GmbH, Schweiz |
| di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat | Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| DMP 30 | Sigma Aldrich GmbH, München |
| (2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)-phenol) | |
| Entellan | Merck KG aA., Darmstadt |
| EPON 812 (Ethylendiamintetraacetic Acid) | Fluka Chemie GmbH, Schweiz |
| Ethanol (30, 50, 70, 90%, absolut) | Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Glukose | Sigma Aldrich GmbH, München |
| Glukoseoxidase Typ VII (Aspergillus niger) | Sigma Aldrich GmbH, München |
| Kaliumdihydrogenphosphat | Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Methanol | Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Methanolisches NaOH | Sigma Aldrich GmbH, München MNA |
| MNA (Methylnacidanhydrid) | Fluka Chemie GmbH, Schweiz |

| | |
|---|-------------------------------|
| Natriumazid | Sigma Aldrich GmbH, München |
| Natriumchlorid (NaCl) | Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Natriumhydroxid (NaOH) | Sigma Aldrich GmbH, München |
| Nickel-2-Sulfat | Sigma Aldrich GmbH, München |
| Paraformaldehyd | Merck KG aA., Darmstadt |
| Propylenoxid | Sigma Aldrich GmbH, München |
| Salzsäure (HCl) | Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| | |
| Toluidinblau | Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan | Fluka Chemie GmbH, Schweiz |
| | |
| Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) | Sigma Aldrich GmbH, München |
| | |
| Xylol | Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |

3.0.2 Geräte

| | |
|---------------------------|------------------------------------|
| Axiovert 200 | Carl Zeiss AG, Jena |
| | |
| Cytomation Pen | Dako, Hamburg |
| | |
| Deckgläser (24x50 mm) | Menzel GmbH & Co, Braunschweig |
| Diamantmesser | Diatome AG, Biel, Schweiz |
| | |
| Objektträger | Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig |
| Olympus BX 50 (Mikroskop) | Olympus, GmbH, Hamburg |
| Olympus DP 10 (Kamera) | Olympus, GmbH, Hamburg |
| | |
| Pipetten | Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf |
| Pipettenspitzen | Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf |
| | |
| Rüttler HS 250 | Janke & Kunkel GmbH, Staufen |

| | |
|-------------------------------------|---|
| Silikonformen | EMD, Washington, USA |
| Ultramikrotom (Reichert Ultracut S) | Leica GmbH, Wetzlar |
| Vortex Mixer Stuart SA8 | Barloworld Scientific Ltd., Staffordshire, UK |
| Wärmeplatte | Medite GmbH, Burgdorf |

3.0.3 Lösungen und Puffer

Perfusions- und Immersionslösung

4 %iges Paraformaldehyd
10 mM PBS
5 % Sucrose
pH 7,4

Phosphate buffered saline (PBS)

| | |
|-------------------------------------|--------|
| di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat | 46,6 g |
| Natriumchlorid (NaCl) | 45,0 g |
| Kaliumdihydrogenphosphat | 9,0 g |

Alle Reagenzien werden mit 5 l Aqua bidest. aufgefüllt und auf einem Magnetrührer bis zur vollständigen Auflösung aller Salze gelöst.

10 x Tris buffered saline (TBS)

| | |
|----------------------------------|----------|
| Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan | 12,114 g |
| Natriumchlorid (NaCl) | 25,200 g |

Beide Stoffe werden mit 150 ml Aqua bidest. aufgefüllt und solange mit Salzsäure (HCl) bzw. Natriumhydroxid (NaOH) verdünnt, bis ein pH von 7,2-7,4 eingestellt ist. Der Lösung wird wieder Aqua bidest. zugegeben, bis ein Volumen von 200 ml erreicht ist.

| | | |
|--------------------------------|--------------|--------|
| 1 x TBS Gebrauchslösung | Aqua bidest. | 900 ml |
| | TBS (10x) | 100 ml |

100 ml der 10fach konzentrierten TBS Lösung werden mit 900 ml Aqua bidest. ergänzt.

| | | |
|--|--|-------|
| Blockade der endogenen Peroxidase | Phosphate buffered saline (PBS) | 80 ml |
| | Methanol | 10 ml |
| | 30 %iges Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) | 10 ml |

Die Substanzen werden vermischt und die Objektträger darin 15 min gebadet.

| | | |
|-------------------|--|-----------|
| JenChromPX | Nickel-2-Sulfat | 300 mg |
| | Tris(hydroxy-methyl)-aminomethane | 180 mg |
| | Glukose | 60 mg |
| | DAB (Diaminobenzidin) | 12 mg |
| | Glukoseoxidase Typ VII (Aspergillus niger) | 40mg/40ml |
| | | |

Zunächst werden Tris(hydroxy-methyl)-aminomethan und Nickelsulfat in etwas Aqua bidest. gelöst. Das angelöste Nickel-2-Sulfat wird dann ersterem hinzugefügt. DAB und die Glukose werden ebenfalls einzeln angelöst und den beiden ersten Reagenzien hinzugefügt. Die Lösung wird in Küvetten mit Aqua bidest. auf 80 ml aufgefüllt. Anschließend wird Glukoseoxidase hinzugefügt und sofort die Objektträger dazugegeben.

| | | |
|----------------------------|---|-------|
| Epoxidharz EPON 812 | EPON 812 (Ethylendiamintetraacetic Acid) | 13 g |
| | DDSA (Dodecenyl-Bernsteinsäureanhydrid) | 8 g |
| | MNA (Methylandicanhydrid) | 6 g |
| | DMP 30 (2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)-phenol) | 1,2 g |

Die einzelnen Substanzen werden gründlich durchmischt.

3.0.4 Antikörper

| | <i>Katalognummer</i> | <i>Antikörper / Hersteller</i> |
|---------------------------|----------------------|--|
| <i>Primärantikörper</i> | — | anti-SHBG 653(3) (in rabbit) (Labor Peter Petrusz, Californien) |
| <i>Sekundärantikörper</i> | A-6154 | anti-rabbit IgG (in goat) (Sigma Aldrich GmbH, München) |
| <i>Tertiärantikörper</i> | P-2026 | Peroxidase-Antiperoxidase (Dako Deutschland GmbH, Hamburg) |

3.1 Gewebebegewinnung

3.1.1 Versuchstiere und Narkose

Als Tierversuchsgruppe wurden Ratten des Stammes Wistar aus der zentralen Tierversuchsanlage des Uniklinikums Jena genutzt. Der Tierversuch wurde vom Thüringer Landesverwaltungsamt unter dem Versuchsprotokoll 02-040/10 genehmigt. Die Tiere wurden unter Standardbedingungen, d. h. ein Tier pro Käfig, unter freiem Zugang zu Wasser und Futter sowie unter künstlichem zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Insgesamt wurden 3 Würfe mit jeweils 12-16 Jungtieren benötigt, wobei sowohl männliche als auch weibliche Tiere verwendet wurden. Nach der Geburt wurden den Würfen an den entsprechenden Entwicklungstagen (s. Tabelle) zwischen 1-4 Jungtiere zur erforderlichen Gewebebegewinnung entnommen. Die Tötung der Ratten erfolgte durch verlängerte Äthernarkose bis zum Eintritt des Todes. Insgesamt wurden 43 Jungtiere benötigt.

| Block | Tag (d) | Block | Tag (d) | Block | Tag (d) | Block | Tag (d) |
|-------|---------|-------|---------|-------|---------|-------|---------|
| 1 | 1 | 12 | 9 | 23 | 14 | 34 | 24 |
| 2 | 2 | 13 | 9 | 24 | 16 | 35 | 24 |
| 3 | 2 | 14 | 9 | 25 | 16 | 36 | 26 |
| 4 | 3 | 15 | 11 | 26 | 16 | 37 | 26 |
| 5 | 3 | 16 | 11 | 27 | 18 | 38 | 28 |
| 6 | 5 | 17 | 11 | 28 | 18 | 39 | 28 |
| 7 | 5 | 18 | 13 | 29 | 20 | 40 | 30 |
| 8 | 7 | 19 | 13 | 30 | 20 | 41 | 30 |
| 9 | 7 | 20 | 13 | 31 | 22 | 42 | 32 |
| 10 | 7 | 21 | 14 | 32 | 22 | 43 | 32 |
| 11 | 9 | 22 | 14 | 33 | 24 | | |

Abb. 05 Übersichtstabelle der untersuchten Entwicklungstage

3.1.2 Gewebegewinnung

Nach Tötung der Ratten mussten die Zielgewebe schnellstmöglich fixiert werden. Dies geschah durch kardiale Perfusion mittels 4 %iger, in PBS gepufferter Paraformaldehydlösung. Dazu wurde der Thorax eröffnet, eine Kanüle in den linken Ventrikel eingebracht und mit einer Gefäßklemme fixiert. Über die Kanüle erfolgte die Perfusion des Blutkreislaufes der Ratte bei Raumtemperatur bis zum Austritt einer klaren Flüssigkeit aus dem eröffneten rechten Atrium. Die Menge des benötigten Fixans orientierte sich dabei etwa am doppelten Körpergewicht der Ratte. Der Perfusionsfixierung folgte die Dekapitation sowie die Eröffnung des Schädeldaches und die Freilegung der Gehirne. Diese wurden entnommen und zunächst in einer Immersionslösung zwei Tage im Kühlschrank bei 4 °C nachfixiert. Anschließend wurden pro Altersgruppe jeweils 4-6 vollständige Gehirne in 67 mM PBS (pH 7,4, isoton mit NaCl) bei 4°C aufbewahrt. Im Folgenden konnten die Kleinhirne mittels Durchtrennung der Kleinhirnstiele vom restlichen Gehirn separiert werden (bis zum 5. Postnataltag wurden aufgrund der geringen Gehirngröße die vollständigen Cerebri verwendet). Die gewonnenen Gewebe entsprachen Teilen des Vermis, der paravermalen Zone, des Spinocerebellums und der Hemisphären.

3.2 Einbettung in Kunstharz (EPON 812) und Herstellung von Semi-Dünnschnitten

3.2.1 Einbettung in EPON 812



Abb. 06 Gewebeblöcke in EPON 812

EPON 812 wurde als Einbettmedium ausgewählt, da es eine dauerhafte Fixation und eine sehr gute Schneidqualität gewährleistet.

Die immersionsfixierten und vom restlichen Gehirn isolierten Kleinhirne wurden über Nacht in PBS gewaschen und unter zweimaligem Pufferwechsel für mehrere Stunden gespült. Anschließend wurden die Gewebe jeweils zwei Stunden in 30%, 50%, 70% und 90% Ethanol entwässert. Eine weitere Entwässerung folgte über 3 x 2 h in 100% Ethanol am folgenden Tag. Anschließend wurden die Kleinhirne zwei Stunden in Propylenoxid gegeben. Währenddessen wurde das Epoxid-Kunstharz zubereitet. Dabei wurden 13,0 g Ethylendiamintetraacetic Acid (EPON 812), 8 g Dodecenyl-Bernsteinsäureanhydrid (Epon-Härter DDSA) und 6 g Methylnadicanhydrid (Epon-Härter MNA) gemischt. Die Reagenzien wurden gründlich vermengt, um möglichst einheitliche Blöcke zu erhalten. Als Polymerisationsbeschleuniger wurde 1,2 g 2,4,6-Tris-(dimethylaminomethyl)-phenol (Epon-Beschleuniger DMP-30) hinzu gegeben. Das Kunsthargemisch wurde danach im Verhältnis von 1:5 zu den Geweben im Propylenoxid gegeben. Die Gewebestücke verblieben bis zum vollständigen Verdunsten des Propylenoxids über Nacht im Kunstharg-Propylenoxidgemisch. Anschließend wurden die Kleinhirne in eine Silikonkautschukform gelegt, positioniert, erneut mit dem Epoxid-Einbettungsmedium überschichtet und 2 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Im Wärmeschränk polymerisierten die Blöcke danach drei Tage bis zur vollständigen Aushärtung bei 55 °C aus.

3.2.2 Herstellung von Semi-Dünnschnitten

3.2.2.1 Beschichtung der Objektträger mit APES

Um die Haftung der Schnitte an den Objektträgern zu verbessern, wurden diese zunächst mit einem Gemisch aus 3-Aminopropyltriethoxysilane (APES) und Azeton behandelt. Dabei wurden 4 ml APES mit 200 ml Azeton aufgefüllt und die Objektträger darin 5 min gebadet. Anschließend blieben sie für weitere 5 min in 2 %igem APES und wurden danach in Aqua bidest mehrmals gespült und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet.

3.2.2.2 Semi-Dünnschnitte



Abb. 07 Herstellung der Semi-Dünnschnitte am Ultracut S

Nach vollständiger Polymerisation der EPON 812 Blöcke konnten nun Semi-Dünnschnitte gewonnen werden. Nach Entfernung der Blöcke aus der Form wurden diese mit Feile und Säge bis zur Freilegung eines Anschnittes für die weiterführende Bearbeitung durch ein Ultramikrotom aufbereitet. Die einzelnen Blöcke wurden mit einem 45°-Diamantmesser des Ultramikrotoms Ultracut S mit einer Dicke von 0,9 -1 μm geschnitten. Die einzelnen Schnitte wurden dabei in einem Wasserbehälter aufgefangen und mit einer Nadel auf die mit APES beschichteten Objektträger übertragen und anschließend auf einer 60 °C warmen Heizplatte 24 h vollständig getrocknet. Um die gewünschten Kleinhirnareale lokalisieren und den Zustand des Gewebes beurteilen zu können, wurden einige Schnitte mit 1 %iger Toluidinblau Lösung gefärbt. Die in der Auswertung fotografisch dargestellten Übersichtsschnitte mit Toluidinfärbung waren im Institut für Anatomie II, Jena bereits vorhanden und wurden nicht neu für die Auswertung angefertigt. Zur besseren Markierung der Kleinhirnschnitte und zu Dokumentationszwecken wurden diese anschließend mit einem Cytomation Pen markiert und mit Bleistift beschriftet.

3.3 Immunhistochemische Methoden

3.3.1 Entharzen der Schnitte

Für die immunhistochemische Färbung mussten die Schnitte zunächst entharzt werden. Dafür wurden sie für jeweils 2 min in methanolischem Natriumhydroxid (NaOH), methanolischem Benzol sowie zweimalig in Azeton behandelt. Danach wurden die Schnitte für 3 x 10 min in PBS gespült.

3.3.2 Blockierung der endogenen Peroxidase

Um unspezifische Färbungen zu vermeiden, erfolgte vor der Inkubation mit dem SHBG-Antikörper eine Blockierung der endogenen Peroxidase über eine fünfzehnminütige Inkubation der Objektträger in 10 mM PBS (pH 7,4 isoton mit NaCl), einer Lösung aus 30 %igem Wasserstoffperoxid (H₂O₂), Methanol und PBS. Dem schlossen sich drei Waschungen in PBS für jeweils 10 min an.

3.3.3 Aufbringen von Antikörpern

Als primärer Antikörper wurde anti-SHBG 653(3) (im Kaninchen hergestellt) aus dem Laboratorium von Peter Petrusz, North Carolina verwendet. Dieser wurde im Verhältnis 1:500 in PBS verdünnt und mit Pipetten auf die Objektträger aufgebracht. Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer bei 4 °C im Kühlschrank über 24 h. Anschließend wurde der ungebundene Antikörperanteil mit PBS für 3 x 10 min abgewaschen. Als sekundärer Antikörper wurde anti-rabbit IgG (in goat) mit einer Verdünnung von 1:100 (in PBS) verwendet. Dieser wurde auf die Objektträger aufgebracht und bei Raumtemperatur 1 h inkubiert und anschließend der ungebundene Anteil wieder 3 x 10 min in PBS abgewaschen. Schließlich wurde mit Peroxidase-Anti-Peroxidase (PAP) als tertiärem Antikörper mit einer Verdünnung von 1:100 ebenfalls 1 h bei Zimmertemperatur inkubiert. Es folgten drei weitere Waschgänge in PBS für jeweils 10 min, danach 3 x 10 min in TBS.

3.3.4 Färbung

Zur Herstellung der Färbelösung wurden 180 mg Tris(hydroxy-methyl)aminomethane, 300 mg Nickel-2-Sulfat, 12 mg Diaminobenzidin (DAB) und 60 mg Glukose in der genannten

Reihenfolge auf 80 ml Aqua bidest. gegeben und verrührt. Der Lösung wurde anschließend Glukoseoxidase zugegeben und das Ganze in eine Färbeküvette gefüllt. Die Objektträger wurden sofort in die Küvette gestellt und darin 15 min bis zum Eintritt einer sichtbaren, leicht schwarzen Verfärbung inkubiert und anschließend für 3 x 10 min in TBS und für 2 min in Aqua bidest. gewaschen.

3.3.5 Entwässern der Schnitte

Zur Entwässerung der Schnitte diente eine aufsteigende Alkoholreihe. Dafür wurden die Objektträger für jeweils 1 x 4 min in 50 %igem, 70 %igem, 90 %igem und für 2 x 4 min in absolutem Alkohol (Ethanol) getaucht; danach wurden sie für jeweils 2 x 7 min in Xylol gegeben, anschließend mit Entellan eingedeckt und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

3.3.6 Kontrollfärbung

Auf vier untersuchte Kleinhirnschnitte folgte eine Kontrollfärbung. Die Kontrollen wurden wie die übrigen Kleinhirnschnitte behandelt, anstelle des primären Antikörpers wurden diese jedoch mit PBS inkubiert. Keine der Kontrollen wies spezifische Immunaktivität auf.

3.4. Mikroskopische Auswertung und Dokumentation

Die mikroskopische Auswertung der mit JenChromPX gefärbten Semi-Dünnschnitte erfolgte mit den Mikroskopen Olympus BX50 und Axiovert 200, die Fotografien wurden unter Verwendung der DP-Soft Software mit der Olympus DP10 Kamera erstellt und ausgewertet. Die Bildbearbeitung erfolgte mit der Software GIMP.

Bei Nagetieren entwickelt sich die Kleinhirnrinde fast vollständig während der ersten drei Postnatalwochen. In dem noch frühen Entwicklungsstadium der Postnatalentwicklung zeigt sie noch nicht den Aufbau ihrer späteren adulten Form, die typische 3-fach Schichtung lässt sich aber bereits gut erkennen. Die Molekularschicht ist sehr schmal und die Purkinjezellschicht in ihrer zukünftigen ausgereiften Struktur als solche noch nicht zu erkennen. An der Grenze zwischen diesen beiden Schichten finden sich lediglich große, längliche Zellen, welche wahrscheinlich Vorläufer der Purkinjezellen darstellen. Die Körnerschicht zeigt zu diesem Zeitpunkt ein durchlässiges Zellbild und nimmt erst später an Dichte zu. Ebenfalls typisch für die frühe Postnatalperiode ist der sehr diffuse, wasser- und gliazellreiche Aufbau des Cortex, der erst nach mehreren Wochen an Komplexität gewinnt und sich verdichtet.

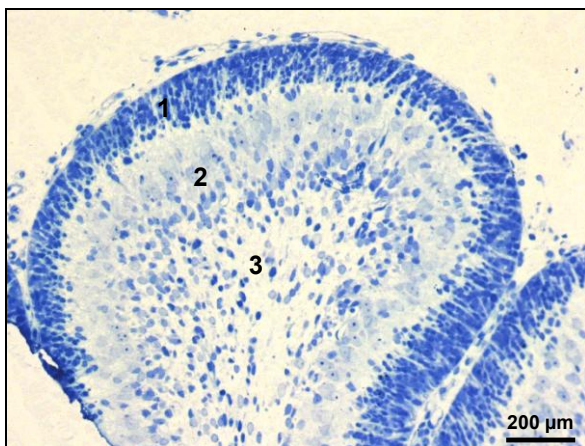


Abb. 08 1. PNT

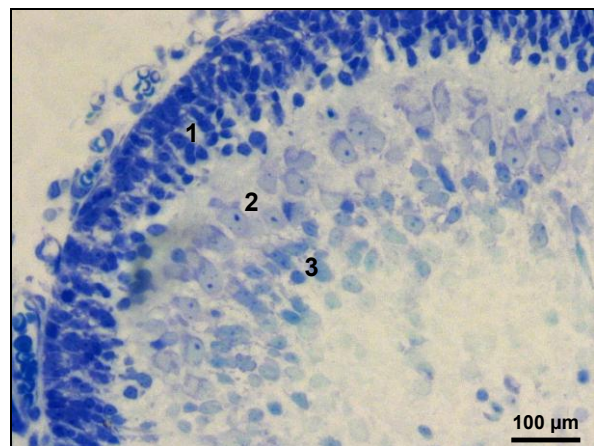


Abb. 9 1. PNT

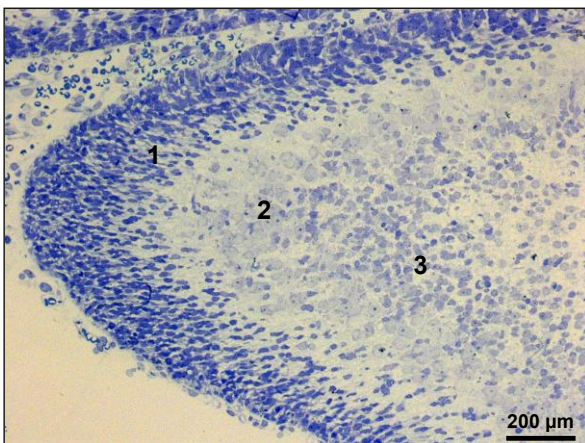


Abb. 10 2.PNT

Abb. 08-10:

Übersichtsfärbungen mit Toluidinblau 1./2.
Postnataltag, Darstellung von:

- 1 Molekularschicht
- 2 Purkinjezellschicht
- 3 Körnerschicht

Beim Vergleich zwischen der Toluidinfärbung und der SHBG-Immunmarkierung zeigen sich fundamentale Unterschiede im histologischen Bild der Kleinhirnrinde. In den Übersichtsfärbungen (**Abb. 08, 9, 10**) scheint die Molekularschicht schon sehr zellreich. In den ersten beiden PNT wird SHBG in der späteren Purkinje-Zellschicht als auch in der Molekularschicht exprimiert. In der Molekularschicht sind am 1. und 2. PNT eindeutig Dendriten und Interneurone mit SHBG-Immunreaktivität zu erkennen. Die Purkinjezellschicht erscheint im Hinblick auf SHBG-Markierung recht heterogen. Zum einen erscheint nur eine Subpopulation von Purkinjezellen eindeutig positiv. Bei näherer Betrachtung sind besonders intensive Markierungslevel eindeutig im perinucleären bzw. nucleären Bereich der Purkinjezellen feststellbar, wobei die cytoplasmatische SHBG Markierung der Purkinjezellen nicht von der interzellulären SHBG Markierung unterschieden werden kann. Auch Dendriten der Purkinjezellen im Bereich der Molekularschicht (**Abb. 11, Pfeile**) sind deutlich SHBG-positiv, ebenso sind in der Körnerzellschicht Körnerzellen und diffuse Nervenfasern immunpositiv. Auch einige Interneurone zeigen eine Färbung.

Am 3. Postnataltag zeigen sich bis auf das Vorhandensein einer höheren Anzahl Körnerzellen (**Abb. 12, Pfeile**), von denen fast alle SHBG-positiv sind, keine gravierenden Unterschiede im Verteilungsmuster immunpositiver Zellen.

An den folgenden Entwicklungstagen sind wieder Vorläufer der Purkinjezellen angefärbt, eine Zunahme immunpositiver Körnerzellen ist zu erkennen. Auch Interneurone sind SHBG positiv.

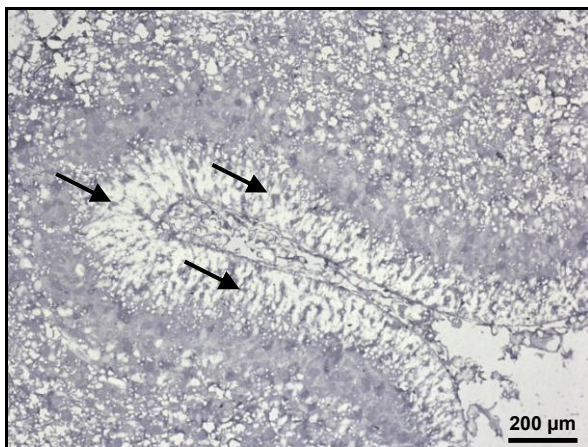


Abb. 11 SHBG positive Purkinjezellendriten, 1. PNT



Abb. 12 SHBG positive Körnerzellen, 3.PNT

Am 5. postnatalen Entwicklungstag sind bereits einige der Purkinjezellvorläufer in das Stratum purkinjense gewandert und haben sich dort angesiedelt. Das Stratum moleculare hat sich weiter verbreitert; dort sieht man vor allem gefärbte Purkinjezeldendriten. Im Bereich des Stratum granulosum ist aufgrund einer Vielzahl ablaufender Mitosen auf eine hohe biologische Aktivität von SHBG und Wachstumsprozesse zu schließen. Ein wesentlicher Befund ist die Fülle von SHBG positiven Purkinjezellen mit einer dominanten SHBG Markierung unter Aussparung der Nucleoli (Abb. 13, Pfeile). Im Stratum granulosum zeigen weniger Körnerzellen eine deutliche Markierung, nur einzelne Zellen sind gefärbt. Auch vereinzelte Interneurone (Abb. 14, Pfeil) sind deutlich immunpositiv.

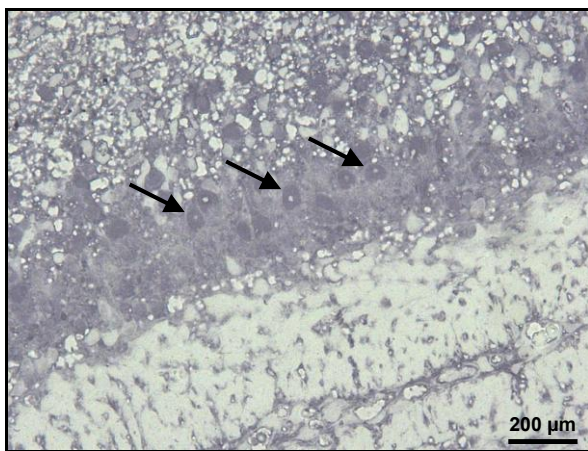


Abb. 13 SHBG positive Purkinjezellen unter Aussparung der Nucleoli, 5. PNT

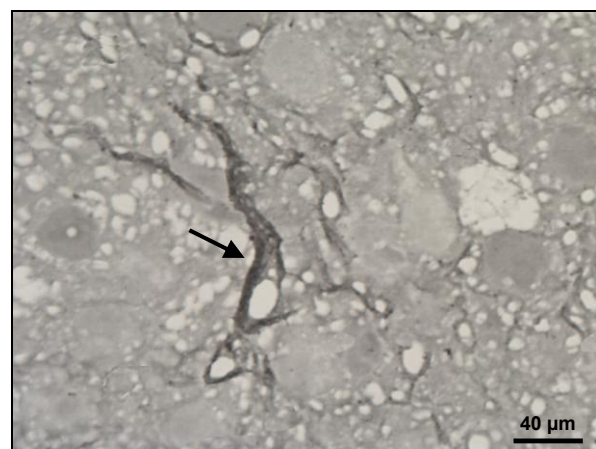


Abb. 14 SHBG positives Interneuron, 5. PNT

Im Zeitraum vom 7.-9. Postnataltag sind Formation und anatomische Strukturierung des Kleinhirncortex etwas deutlicher ausgeprägt als an den vorhergehenden Tagen. Das Stratum moleculare hat sich deutlich abgegrenzt, im Dickenwachstum zugenommen, und zeigt in Hinblick auf die vorliegende SHBG Markierung ein recht heterogenes Bild. Dort sind einige Dendriten der Purkinjezellen immunpositiv. Besonders auffallend sind wiederum die stark immunpositiven Zellen des Stratum purkinjense (Abb. 15, Pfeile), die in diesem Zeitraum eine hohe Expression von SHBG aufweisen. Auffallend ist erneut auch eine starke nucleäre SHBG Markierung. Im Stratum granulosum sind nur wenige Körnerzellen SHBG positiv. Auch anhand der Übersichtsfärbung mit Toluidinblau (Abb. 16) ist eine zelluläre Reifung zu erkennen. Vor allem die Körnerschicht hat an Zelldichte gewonnen, aber auch im Bereich der Molekularschicht sind komplexere Zellverbände erkennbar.

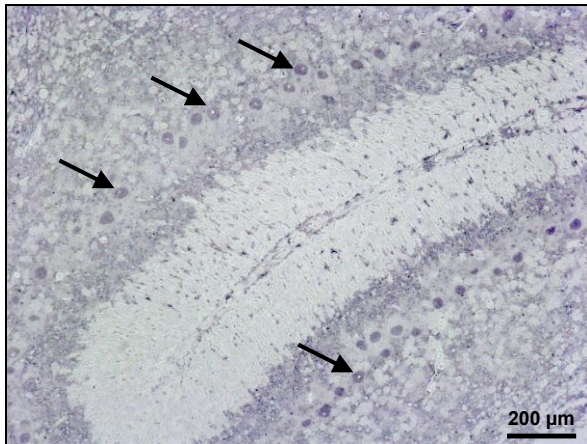


Abb. 15 SHBG positive Neurone im Stratum purkinjense, 9. PNT

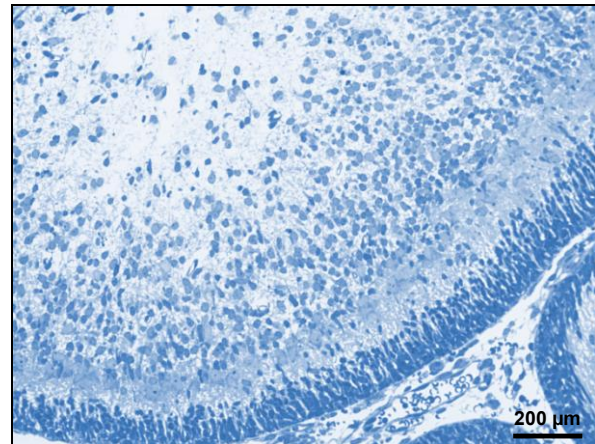


Abb. 16 Übersichtsfärbung Kleinhirnrinde, 9. PNT

Am 11. postnatalen Entwicklungstag zeigen weniger Purkinjezellen (**Abb. 17, Pfeile**) eine spezifische Färbung, wohingegen ihre Dendriten deutlich auf SHBG angefärbt werden konnten. Im Stratum granulosum scheint aufgrund von nur vereinzelt angefärbten Körnerzellen die Aktivität von SHBG ebenfalls leicht nachgelassen zu haben. Die Dicke der Kleinhirnrinde hat weiter zugenommen (**Abb. 18**).

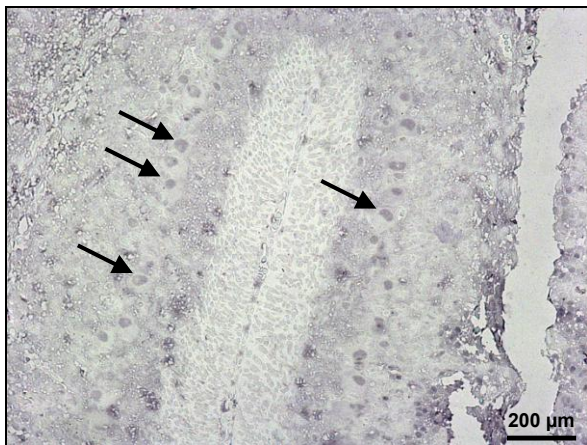


Abb. 17 SHBG positive Purkinjezellen, 11. PNT

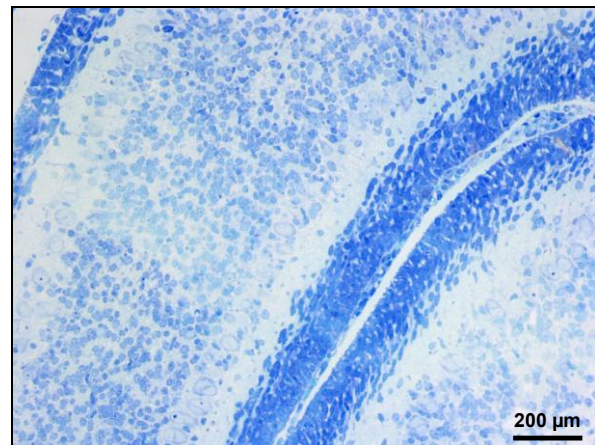


Abb. 18 Übersichtsfärbung Kleinhirnrinde, 11. PNT

Am 13. Tag nach Geburt sind wieder mehr Dendriten von Purkinjezellen dargestellt. Das Stratum moleculare hat sich weiter verdickt und die Purkinjezellen siedeln sich in ihrem späteren Zielort im Stratum purkinjense an. Eine stärkere Färbung von Körnerzellen im Stratum granulosum ist deutlich zu sehen (**Abb. 19, Pfeile**).

Am 14. postnatalen Entwicklungstag zeigt die Molekularschicht schwache, diffuse Färbungen im Bereich der Kletterfasern und Parallelfasern. Auffällig sind zahlreiche kleine, stark immunpositive Zellen (**Abb. 20, 21, Pfeile**), die ebenfalls im Bereich des Stratum moleculare lokalisiert sind. Auffallend wenig Färbungen finden sich im Bereich der Purkinjezellen, bei denen sowohl das Zellplasma als auch die Zellkerne kaum angefärbt sind. Weiterhin scheint die Zahl markierter Körnerzellen angestiegen zu sein, ca. ein Drittel zeigt Immunreaktivität.

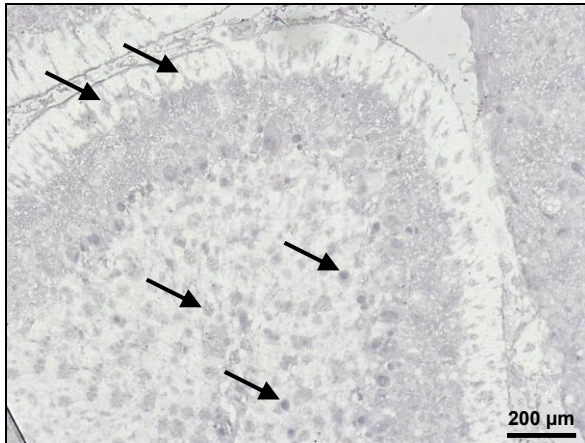


Abb. 19 SHBG positive Körnerzellen im Stratum granulosum, 13.PNT

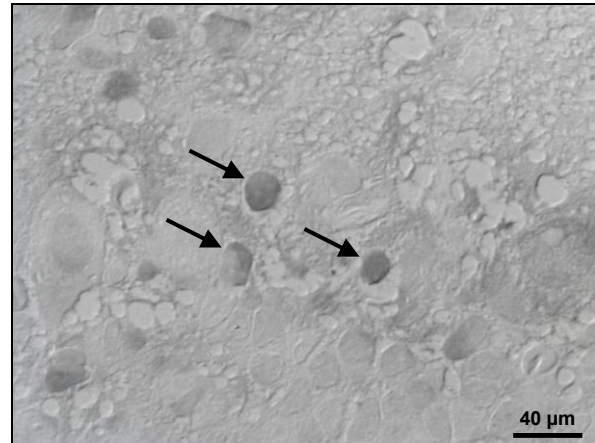


Abb. 20 SHBG positive Neurone im Stratum moleculare, 14.PNT

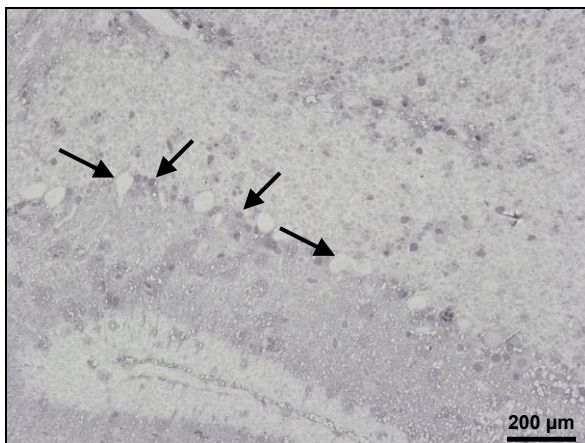


Abb. 21 SHBG positive Neurone im Stratum moleculare, 14. PNT

Am 15.-16. Tag postnatal hat das Stratum moleculare in Vergleich zu früheren Entwicklungstagen an Dicke weiter zugenommen (**Abb. 22**). Einzelne Dendritenbäumchen der Purkinjezellen sind gefärbt, die Purkinjezellen an sich allerdings schwächer als an den Vortagen (**Abb. 23**). Nur wenige Körnerzellen zeigen eine Färbung. In der Molekularschicht ist eine diffuse Anfärbung von Neuronen deutlich sichtbar (**Abb. 24, Pfeile**).

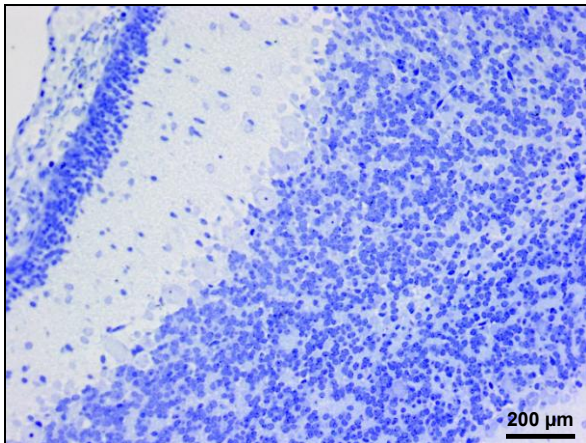


Abb. 22 Übersichtsfärbung Kleinhirnrinde, 16.PNT

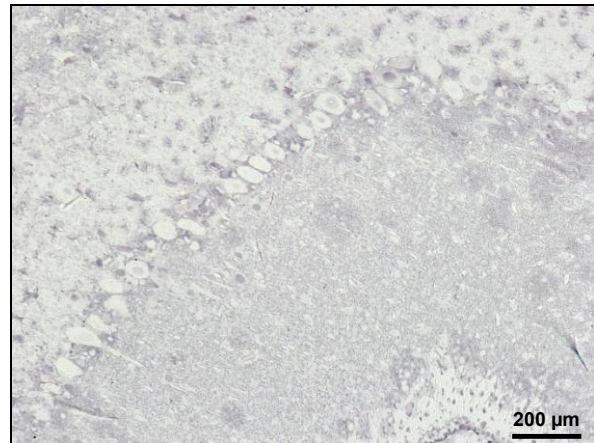


Abb. 23 schwach SHBG positive Purkinjezellen in der Molekularschicht, 16.PNT

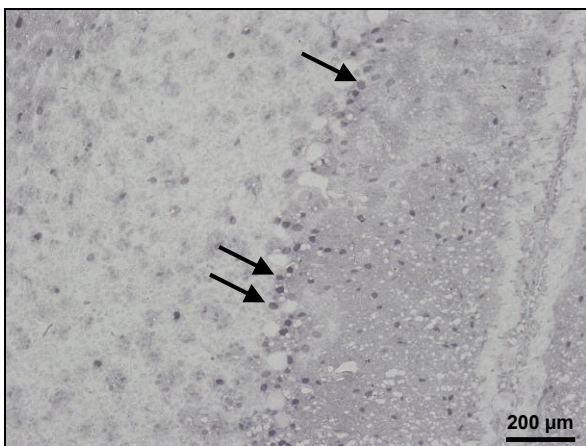


Abb. 24 SHBG positive Neurone in der Molekularschicht, 16. PNT

Am 18. Postnataltag sind einige Körnerzellen, aber nur wenige Purkinjezellen gefärbt. Die einzelnen Purkinjezellen zeigen dabei unterschiedliche Färbungen; sie sind häufig entweder zytoplasmatisch und nukleär (**Abb. 25-1**) oder nur nukleär (**Abb. 25-2**) angefärbt. SHBG ist vor allem in einzelnen Zellen in der Zirkumferenz der Purkinjezellen sowie im kaudalen Drittel der Molekularschicht aktiv. Die Molekularschicht ist dabei durchgehend homogen gefärbt. Die Kleinhirnrinde nimmt weiter an Dicke zu, die einzelnen Schichten sind immer besser differenzierbar (**Abb.26**).

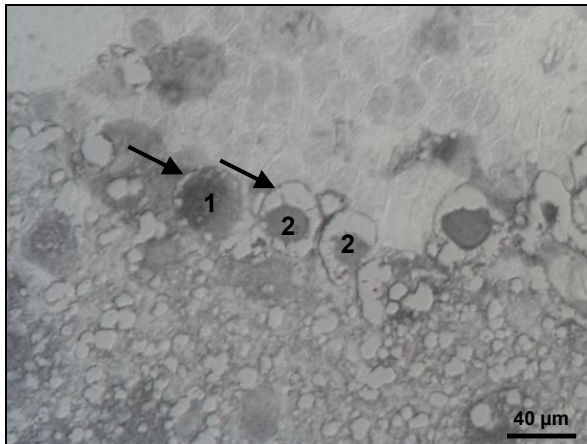


Abb. 25 SHBG positive Purkinjezellen, zytoplasmatisch und nukleär gefärbt (1), nukleär gefärbt (2), 18.PNT

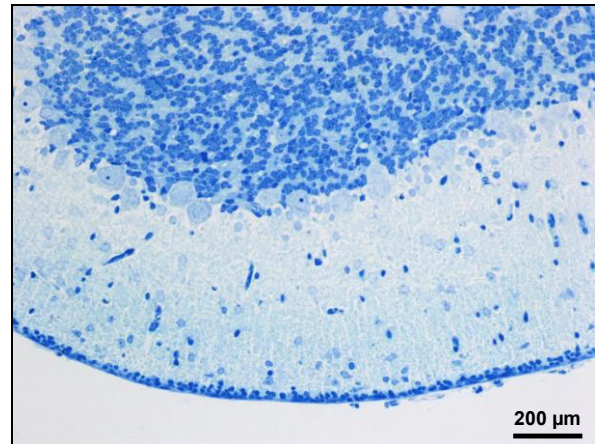


Abb. 26 Übersichtsfärbung Kleinhirnrinde, 18.PNT

Am 20. Postnataltag sieht man einzelne Zellen in der Molekularschicht mit positiver Färbung, auch weisen die Dendriten der Purkinjezellen eine leichte Färbung auf, die Purkinjezellen an sich sind jedoch zum größten Teil negativ. Insgesamt ist die generell sinkende Aktivität immunpositiver Neurone auffallend, v. a. Purkinjezellen weisen kaum noch spezifische SHBG-Aktivität auf und auch unter den Körnerzellen nimmt in der Zahl SHBG-positiver Zellen ab. Lediglich in der näheren Umgebung der Purkinjezellen finden sich weiter vereinzelt stark positive Interneurone und auch die Molekularschicht ist gleichmäßig homogen gefärbt (**Abb. 27**).

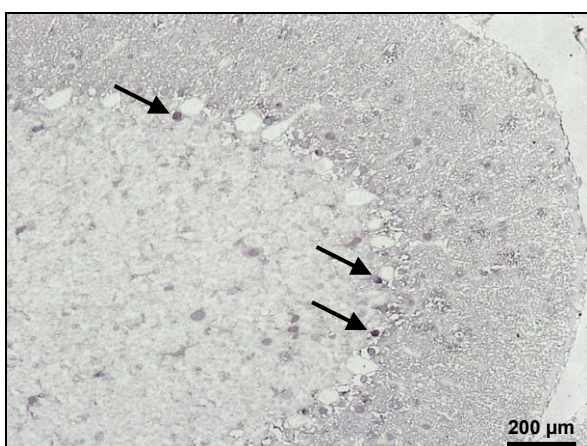


Abb. 27 SHBG positive Neurone in der Umgebung der Purkinjezellen, 20. PNT

Am 22. Postnataltag verhält sich die Verteilung positiver Zellen ähnlich: Während vereinzelte Körnerzellen im Stratum granulosum gefärbt sind (**Abb. 28, Pfeile**), finden sich kaum positive Purkinjezellen. In ihrer Gesamtentwicklung schreitet die Reifung des Cortex cerebelli weiter voran. Die einzelnen Schichten nehmen nun immer mehr ihre spätere adulte Form an, die Purkinjezellen reifen aus und sind fast vollständig im Stratum purkinjense angesiedelt. Die einzelnen Schichten werden zellreicher und komplexer in Aufbau und Struktur, das Cerebellum vergrößert sich weiter in Umfang und Volumen (**Abb. 29**).

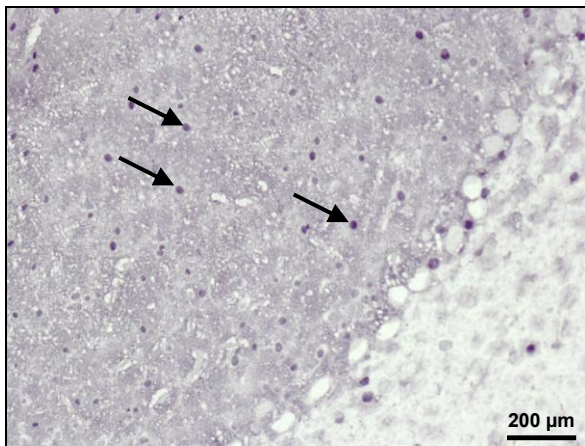


Abb. 28 vereinzelte SHBG positive Körnerzellen im Stratum granulosum, 22. PNT

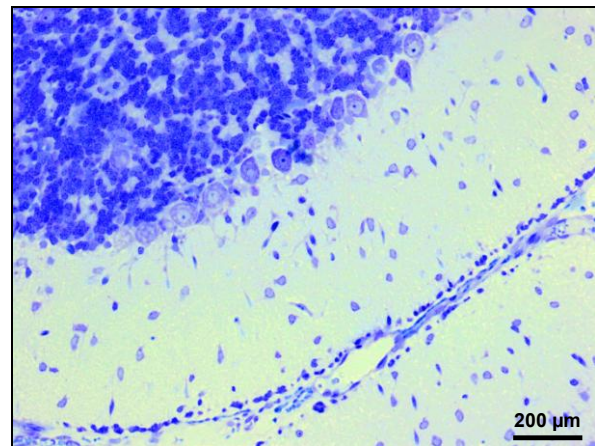


Abb. 29 Übersichtsfärbung Kleinhirnrinde, 22.PNT

Am 24. Tag nach Geburt zeigen sich zahlreiche positive Zellen im Stratum moleculare (**Abb.30-1**), die Purkinjezellen (**Abb.30-2**) sind deutlich negativ. Im Stratum granulosum (**Abb.30-3**) sind viele gefärbte Körnerzellen zu sehen. In der Übersichtsfärbung wird die Dreiteilung der Kleinhirnrinde deutlich (**Abb. 31**).

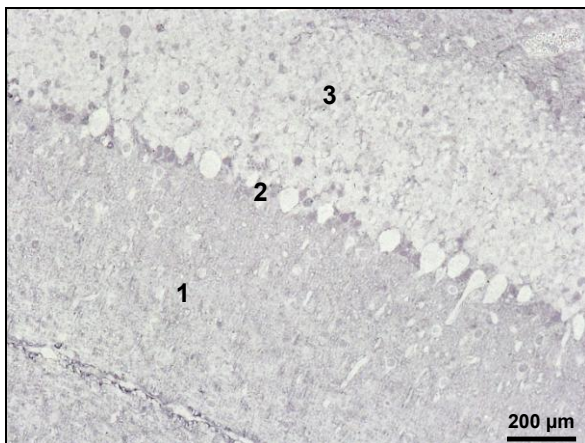


Abb. 30 SHBG positive Neurone in der Kleinhirnrinde, 24.PNT

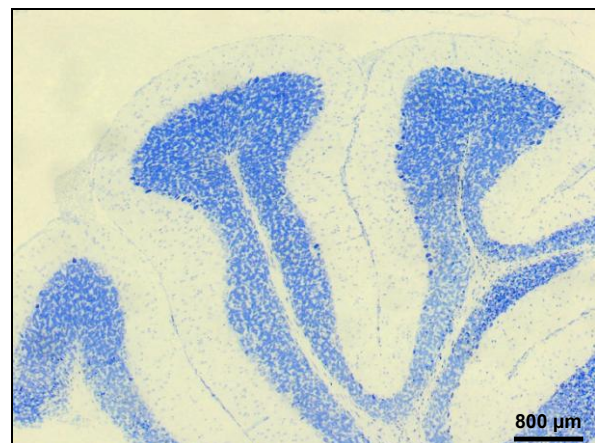


Abb. 31 Übersichtsfärbung Kleinhirnrinde, 24.PNT

Kaum gefärbte Purkinjezellen sind auch am 26. Postnataltag vorhanden. Lediglich einzelne SHBG-positive Zellen sind in der Nähe der Purkinjezellen lokalisiert. Die Molekularschicht scheint homogen gefärbt zu sein, dabei handelt es sich größtenteils um die Dendriten der Purkinjezellen. Einzelne immunpositive Körnerzellen und Interneurone finden sich auch im Stratum granulosum (**Abb. 32, Pfeile**). An den folgenden Tagen gibt es keine signifikanten Veränderungen mehr bezüglich Anfärbbarkeit von Zellen oder Fasern.

Zwei Tage später sind die Purkinjezellen (**Abb. 33-2**) nach wie vor negativ, wiederum sind deren Dendriten in der Molekularschicht (**Abb. 33-1**) gefärbt und auch in der Körnerzellschicht (**Abb. 33-3**) sind erneut einzelne Körnerzellen immunhistochemisch gefärbt.

Auch am 30. Postnataltag sind wieder die komplett ungefärbten Purkinjezellen deutlich sichtbar. Vereinzelt sind leicht gefärbte Körnerzellen (**Abb. 34**) im gesamten Stratum granulosum nachweisbar. Auch die Molekularschicht weist eindeutig immunreaktive Zellen auf.

Am 32. Entwicklungstag hat der Cortex cerebelli seine endgültige Dicke erreicht. Die Molekularschicht ist im Vergleich zu frühen Entwicklungstagen erkennbar verbreitert und hat nun ihre definitive Form erlangt. Das Stratum purkinjense stellt sich als einreihige Schicht aus Purkinjezellen dar. Die Struktur des Stratum granulosum hat sich deutlich verdichtet. Die spezifische Färbung auf SHBG zeigt wie an den vorangehenden Tagen negative Purkinjezellen (**Abb. 35-2**), in der Molekularschicht (**Abb. 35-1**) finden sich wieder einzelne positive Zellen. Vornehmlich sieht man aber einzelne, leicht immungefärbte Zellen, die sich hauptsächlich in der Peripherie der Purkinjezellen und im koronaren Teil der Körnerzellschicht befinden (**Abb. 35-3**). Insgesamt ist die Anzahl immunpositiver Neurone stark gesunken, mit Beginn der vierten Postnatalwoche ist die Aktivität von SHBG offensichtlich stark abgefallen. In der Übersichtsaufnahme vom 28. PNT (**Abb. 36**) sieht man die deutliche Strukturierung der Kleinhirnrinde in ihre drei Schichten, ihre definitive Reifung ist nun fast vollendet.

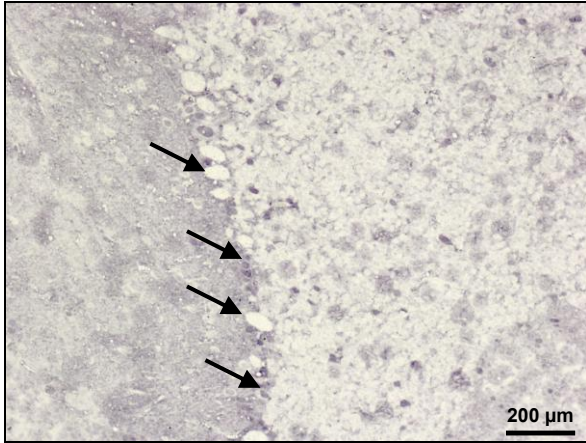


Abb. 32 SHBG positive Interneurone, SHBG negative Purkinjezellen, 26. PNT

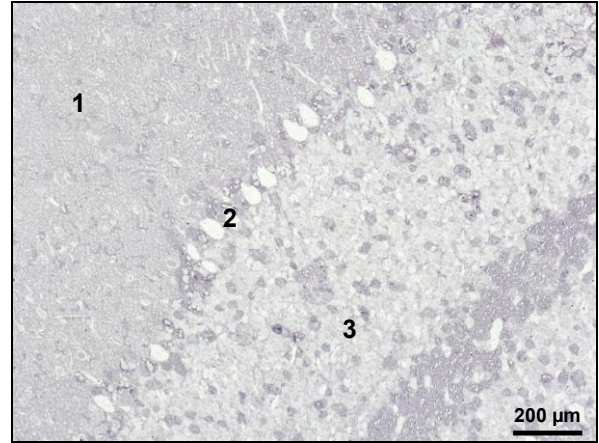


Abb. 33 SHBG positive Purkinjezellendriten (1) SHBG negative Purkinjezellen (2), SHBG positive Körnerzellen (3), 28. PNT

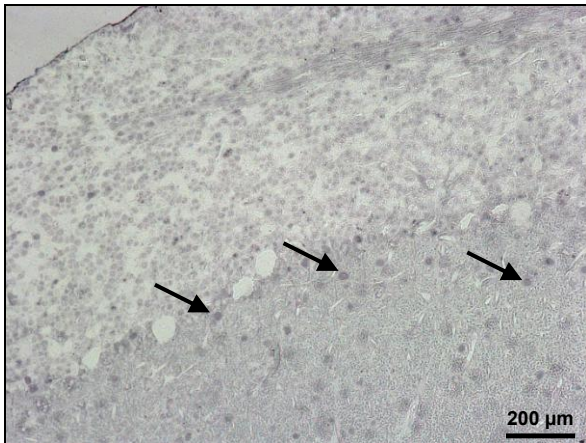


Abb. 34 SHBG positive Interneurone im Stratum granulosum, 30. PNT

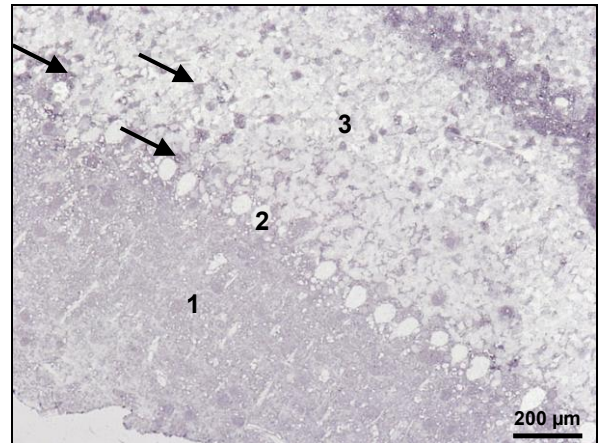


Abb. 35 SHBG positive Interneurone im Stratum moleculare (1) und im Stratum granulosum (3), SHBG negative Purkinjezellen (2), 32. PNT

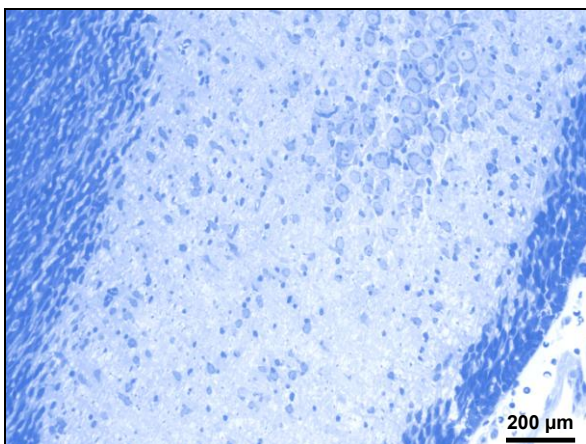


Abb. 36 Übersichtsfärbung Kleinhirnrinde, 28. PNT

Verteilungsmuster immunpositiver Neurone

| Tag | Purkinjezellkerne | Körnerzellen | Purkinjezell- dendriten | Interneurone |
|-----|-------------------|--------------|----------------------------|--------------|
| 1 | ++ | ++ | +++ | ++ |
| 2 | ++ | ++ | + | ++ |
| 3 | ++ | +++ | + | ++ |
| 5 | ++++ | ++++ | ++ | + |
| 7 | ++++ | ++++ | ++ | + |
| 9 | ++++ | ++ | +++ | + |
| 11 | +++ | ++ | +++ | + |
| 13 | ++ | ++ | ++ | + |
| 14 | + | +++ | ++ | ++ |
| 16 | + | ++ | + | +++ |
| 18 | + | +++ | + | +++ |
| 20 | + | ++ | + | ++ |
| 22 | +/- | ++ | + | ++ |
| 24 | — | ++ | + | ++ |
| 26 | — | ++ | ++ | ++ |
| 28 | — | ++ | ++ | ++ |
| 30 | — | ++ | + | ++ |
| 32 | — | + | + | + |

+ sehr geringe Immunreaktivität
 ++ geringe Immunreaktivität
 +++ mittlere Immunreaktivität
 ++++ hohe Immunreaktivität
 — keine Immunreaktivität

Neben der Regulation von Gleichgewicht, Koordination und anderen motorischen Fertigkeiten ist das Kleinhirn auch an der Beeinflussung einer großen Anzahl kognitiver und emotionaler Funktionen beteiligt. Es stellt die wichtigste Kontrollinstanz der Willkürmotorik dar und durchläuft v. a. im Laufe der Kindheit und Pubertät einen umfassenden morphologischen Wandel, der naturgemäß auch mit hormonellen Veränderungen einhergeht.

Der strukturelle und neuronale Wandel des Kleinhirns in der frühen Postnatalzeit scheint sich auch in der Expression des SHBG und demzufolge in der Verfügbarkeit seiner Liganden widerzuspiegeln.

Bisherige Untersuchungen zur zellulären Wirkung von Steroiden im Kleinhirn lassen viel Raum für Spekulationen. Steroidbindungshormone wie das SHBG spielen demnach nicht nur eine ausschlaggebende Rolle bei deren Metabolismus, Funktion und Regulierung. Da Sexualhormone wie Östrogene auch nachweislich die neuronale, strukturelle und evtl. sogar die unterschiedliche geschlechtliche Entwicklung des Cerebellums beeinflussen, kommt auch ihren spezifischen Bindungsglobulinen während dessen früher Entwicklungs- und Reifephase offensichtlich eine äußerst komplexe Funktionsvielfalt zu.

Das Gehirn reagiert womöglich weitreichender auf gonadale Steroide, als bislang angenommen. Nicht nur z. B. Strukturen wie der Hippocampus, der während der Reifung durch diese Hormone einer geschlechtsspezifischen Wandlung unterworfen ist, sondern besonders auch das Kleinhirn zeigt eine hohe Sensitivität für Sexualhormone wie den Östrogenen (McEwen 2001).

Während sich das menschliche Kleinhirn über einen relativ langen Zeitraum, der sich von der frühen Embryonalperiode bis in die ersten postnatalen Jahre hinzieht (ten Donkelaar et al. 2003), entwickelt, ist die Reifung des Rattencerebellums bereits nach ca. 4-5 Wochen vollständig abgeschlossen. Diese Arbeit befasst sich mit der Lokalisation, der Verteilung und den quantitativen Veränderungen von SHBG während des 1.-32. postnatalen Entwicklungstages der Kleinhirnentwicklung der Ratte.

Zahlreiche Hormone samt spezifischer Rezeptoren werden im Cerebellum exprimiert und regulieren dessen Entwicklung und Plastizität. Besonders Neuropeptide und Neurotransmitter beeinflussen maßgeblich dessen Entwicklung und spätere Funktion (Koibuchi 2008).

Unsere Ergebnisse bestätigen die Expression von SHBG in verschiedenen Neuronenarten der Kleinhirnrinde während des beschriebenen Zeitraums, die einer enormen Dynamik unterworfen ist. Die Veränderungen in der Verteilung und Anzahl der Zellen im Laufe des Reifeprozesses deuten auf komplexe Funktionen und eine äußerst weitreichende Bedeutung von SHBG (sowie von Sexualhormonen) bei der Entwicklung des Kleinhirns hin.

SHBG konnte in den letzten Jahren in zahlreichen Körpergeweben nachgewiesen werden. Das Gehirn produziert neben Reproduktionsorganen wie Ovar, Uterus, Testis, Prostata (Forges et al. 2005, Hryb et al. 2002, Herbert et al. 2005, Misao 1997, oder Leber (Gershagen et al. 1998) und Kardiomyozyten (Schock et al. 2006) SHBG. Proteine dieser Größe können die Blut-Hirn-Schranke normalerweise nicht überwinden, was für eine intrinsische Produktion spricht. Die Lokalisation von SHBG und dessen kodierenden Transkripten in Kernen des Hypothalamus konnte sowohl im Menschen als auch in Ratten nachgewiesen werden und unterstützt die Annahme, es könnte weitere intrinsische Syntheseorte innerhalb des ZNS geben (Herbert et al. 2003, 2005, Wang et al. 1990).

Auch die Entdeckung, dass SHBG von Neuronen und Gehirnzellen aktiv aufgenommen wird, unterstreicht seine Bedeutung innerhalb des ZNS (Caldwell et al. 2007).

Die mit einer Geburt und anschließender Stillzeit einhergehenden hohen Spiegel von ovariellen und adrenalen Steroidhormonen im Blutkreislauf stimulieren die Expression von Bindungsglobulinen. So zeigten unsere Ergebnisse in der ersten postnatalen Entwicklungswoche v. a. im Bereich der Purkinjezellen und Körnerzellen eine hohe Immunreaktivität, welche an Tag 5-9 ihr Maximum erreichte. Vor allem Purkinjezellen sind höchstwahrscheinlich ein wesentlicher Ausgangspunkt für die postnatale Entwicklung der Kleinhirnrinde. Insbesondere in frühen, kritischen, stressbelasteten postnatalen Lebensabschnitten fanden sich hohe SHBG Spiegel besonders in den Kompartimenten (Dendriten, cytoplasmatisch, nucleär) der Purkinjezellen, sowie in Körnerzellen und Interneuronen. Die Geburt sowie die Augenöffnung der Jungtiere am 7. PNT korrelieren in der ersten Lebenswoche mit dem Maximum der SHBG Expression. Zusätzlich dazu sind bereits erwähnte erhöhte Sexualhormonspiegel des Muttertieres nach der Geburt und durch Stillen wohl maßgeblich für die ausgeprägten hohen Immunreaktivitäten. Die Muttermilch enthält in den ersten Tagen hohe Östrogen- und Androgenspiegel. Diese Beobachtungen unterstützen die Thesen über die Transportfunktionen, Pufferfunktionen bei zu hohen Hormonspiegeln und evtl. auch die Funktion als Wachstumsfaktor von SHBG. Im Gehirn wird die Bioverfügbarkeit von Androgenen maßgeblich durch SHBG geregelt, indem es eine Art Pufferfunktion ausübt, sodass diese nicht durch endogene Enzyme

wie z. B. die P450 Aromatase in Östrogen umgewandelt werden können. Durch die Bindung des Hormons an sein spezifisches Bindungsglobulin wird dieses vor chemischer Umwandlung geschützt. Die Synthese der Steroid-Bindungsglobuline an sich ist wiederum auch steroidabhängig; d. h. das Sexualhormon kann Synthese und Sekretion seines spezifischen Bindungsglobulins direkt beeinflussen und steuern (Caldwell et al. 2000). Dabei liegt keine lineare Dosis-Wirkungs-Beziehung vor, denn niedrige Steroidlevel stimulieren und hohe hemmen die Produktion des Globulins. Freies SHBG ist in der Lage, sich reversibel entweder an Steroide oder seinen putativen Rezeptor zu binden. Hat SHBG ein Steroidhormon gebunden, kann es nicht mehr an seinen Rezeptor binden, an einen Rezeptor gebundenes SHBG kann dagegen Steroidhormone binden (Hryb et al. 1990). So kann SHBG effektiv hohe Sexualhormonspiegel regulieren.

Östrogene (von SHBG transportiert) fördern bekannterweise im Gehirn axonales und dendritisches Wachstum und sind entscheidend während cerebellärer kortikaler Entwicklungsstadien (Rees et al. 2010). Diese modulierenden Funktionen der Steroidhormone in den frühen postnatalen Tagen scheinen hier ebenfalls zum Ausdruck zu kommen und sind offensichtlich nicht auf einzelne Neuronenarten begrenzt.

Schon während der Embryogenese spielen Östrogene eine entscheidende Rolle bei der Gehirnentwicklung; sie regulieren die Reifung verschiedener Gehirnstrukturen und leisten einen wichtigen Beitrag zur Modulation ihrer Funktionen. Östrogenrezeptoren kommen u. a. während der Fetalentwicklung sowohl in der Lunge als auch im Gehirn von Primaten und Menschen vor und sind somit enorm wichtig für die normale Entwicklung dieser Strukturen. Es wird ebenfalls vermutet, dass SHBG bei der intrazellulären Kompartimentalisierung und dem Transport der Steroidhormone in den Zellkern direkt beteiligt ist (Avvakumov et al. 1986). Der Steroidtransport in eine Zelle ist alles andere als trivial, die dargestellte dominante SHBG-Markierung des Kernes (z. T. unter Aussparung der Nucleoli) an frühen Entwicklungstagen stützt aber Avvakumovs Vermutung und spricht für einen solchen aktiven Transport in den Nukleus. Darüber hinaus existiert auch die cytoplasmatische SHBG Immunmarkierung der Purkinjezellen, die sich allerdings nicht vom interzellulären SHBG Level diskriminieren lässt. Das könnte auf sich entwickelnde neuronale Verschaltungen (wie z.B. Moos- und Kletterfasersysteme) zurückgeführt werden.

Interessanterweise scheinen Purkinjezellen neugeborener Nagetiere außerdem in der Lage zu sein, während entscheidender cerebellärer Entwicklungsphasen aktiv diverse Formen von Neurosteroiden (incl. Östradiol) bilden zu können (Dean und McCarthy 2008). Auch diese

Vermutungen korrelieren mit der von uns dargestellten hohen Immunreaktivität im Bereich der Purkinjezellen in der ersten Postnatalwoche.

In enger Beziehung dazu ist der Markierungslevel der Körnerschicht zu sehen, wobei die Intensität der SHBG Markierung allerdings bereits nach dem 7. PNT abfällt. Man könnte daraus schlussfolgern, dass die Körnerzellschicht gewissermaßen als Initiator für die Entwicklung der Purkinjezellschicht und damit mit zeitlicher Verzögerung der Differenzierung ihrer Dendritenbäume fungiert.

Sendemir et al. 2006 wiesen bereits nach, dass im Hypothalamus der Ratte die mittleren SHBG-Spiegel und Expression während Schwangerschaft, Geburt und Stillzeit hohen Schwankungen unterlagen. Die Immunaktivität von SHBG stieg während der Trächtigkeit und Geburt stark an und fiel auffällig während der Geburt und in der frühen postnatalen Periode aufgrund des Abfalls plazentar gebildeter Hormone. Im Laufe der neonatalen Entwicklung hat besonders Östradiol einen positiven Einfluss auf das Wachstum von Dendriten und die Synaptogenese bei sich entwickelnden Purkinjezellen (Haraguchi et al. 2011). Dabei wirken die Östrogene über die intranuklearen ligandenaktivierten Transkriptionsfaktoren ER α und ER β und regulieren zahlreiche Abläufe im ZNS (O'Malley 1990). Diese Steroidrezeptoren sind größtenteils im Zytoplasma und Nukleus lokalisiert (Mainwaring 1975), wobei eine einzelne Zelle Rezeptorproteine für mehr als ein Steroidhormon besitzen kann. 90% der Steroide sind proteingebunden, wobei spezifische Steroid-Rezeptorprotein-Konzentrationen eine Abhängigkeit von anderen Hormonspiegeln zeigen. Die extrazelluläre Steroidkonzentration, die für eine Aufnahme in die Zelle verfügbar ist, bewegt sich zwischen 10^{-8} – 10^{-10} M. Da offenbar sowohl extra- als auch intrazelluläre Bindungsproteine Einfluss auf die intrazelluläre Steroidkonzentration haben, widerspricht dies der Hypothese der Steroidaufnahme durch vornehmlich freie Diffusion (McCarty 1977).

Im Laufe der embryonalen Hirnentwicklung beeinflusst vorwiegend ER β die Schichtbildung des Kortex und die Migration von Interneuronen (Fan et al. 2008). Studien zeigen, dass bei Nagetieren ER α den prädominanten Rezeptor im Hypothalamus darstellt und Reproduktionsmechanismen kontrolliert. ER β beeinflusst dagegen nicht-reproduktive Vorgänge und scheint der hauptsächliche ER-Subtyp der Hirnrinde, des Hippocampus, des Kleinhirns, der Kerne und der dorsalen Raphe zu sein.

Die zahlreichen Funktionen von Steroiden innerhalb des Gehirns sind alles andere als trivial. Bis dato sind drei nicht-genomische Mechanismen für Steroidwirkweisen bekannt. Membran-gebundene Steroidrezeptoren wurden identifiziert und mit second messenger Kaskaden in

Verbindung gebracht. Die Bindung von Steroiden an diese Rezeptoren könnte in einer Aktivierung von Proteinkinasen, Kalziumkanälen oder in der Exozytose von Membranvesikeln resultieren (McEwen 1994). Steroide haben auch eine spezifische Bindungsdomäne an Neurotransmitter-Rezeptoren, im Besonderen den GABA-Rezeptor. Die Bindung an solche Rezeptoren moduliert neuronale Aktivität durch Veränderungen post-synaptischer Inhibition. Die dritte potentielle nicht-genomische Steroidwirkung ist die Einschleusung von lipophilen Steroiden in die Membran von Zielzellen (Whiting et al. 2000).

Bei Nagetieren scheint die Periode der höchsten Steroidsensitivität perinatal zu sein und zieht sich in die frühe postnatale Entwicklungszeit. Dies dürfte mit dem Wegfall des östrogenbindenden α -Fetoproteins zusammenhängen (Toran-Allerand 1978). Am 7. Postnataltag öffnen die Jungtiere ihre Augen. Ab diesem Zeitpunkt ist eine rapide und komplexe Entwicklung ihrer motorischen Fertigkeiten notwendig, besonders im Bereich der Seh- und extrapyramidalen Bahnen. Dies würde ebenfalls für die hohe SHBG Immunreaktivität am Ende der ersten Woche sprechen.

Die Umgestaltung des jungen Gehirns wird durch eine Vielfalt verschiedener Mechanismen gewährleistet, welche mit einer Vergrößerung der Zellzahl, der Vervollständigung von dendritischem und axonalem Wachstum und regressiven Abläufen wie Apoptose und synaptischer Regulierung einhergehen (Neufang et al. 2009.) Diese Prozesse werden sowohl von Androgenen (MacLusky et al. 2006) als auch von Estrogenen beeinflusst (Galea et al. 2006). Auch in der zweiten postnatalen Entwicklungswoche exprimierten sowohl Purkinje- und Körnerzellen als auch Interneurone und Purkinjezellendriten SHBG, wobei die Immunreaktivität in Purkinjezellen bis zum 14. postnatalen Entwicklungstag stark rückläufig war. Ihre Dendriten zeigten aber weiterhin eine moderate Immunreaktivität. In der 2. Postnatalwoche werden die Synapsen der Kletterfasern gebildet. SHBG in Dendriten oder Purkinjezellen könnte hier als neurotropher Faktor wirken. Die Körnerzellen waren durchgängig SHBG positiv und zeigten nur einen leichten Abfall der Immunaktivität. Somit scheinen auch in der zweiten Entwicklungswoche Sexualsteroiden auf die zelluläre und strukturelle Reifung des Cerebellums erheblichen Einfluss zu nehmen. Bisher sind zwei unterschiedliche Mechanismen der Wirkung von Sexualsteroiden auf die Gehirnmorphologie bekannt (Cooke et al. 1998). Die sogenannte "Organisation" ist ein Entwicklungsmechanismus, bei dem Steroide während kritischer Phasen die permanente, sexuell dimorphe Differenzierung modulieren, welche zu männlichem und weiblichem Verhalten sowie der Physiologie im Erwachsenenalter führt. Der andere Mechanismus, die „Aktivierung“, besteht in der Wirkung gonadaler Hormone im voll

entwickelten ZNS und ist verantwortlich für die Aufrechterhaltung geschlechtsspezifischer Verhaltensmuster im Erwachsenenalter (Breedlove und Hampson 2002). Steroidhormone wirken somit nicht nur strikt aktivierend, sondern sie modulieren und beeinflussen auch direkt neuronale Verschaltungen in der Pubertät (Romeo et al. 2002).

In welchem endgültigen Ausmaß das Kleinhirn ein Steroidtarget darstellt, muss weiter erforscht werden. Experimentelle Studien konnten mittels quantitativer RT-PCR, in-situ Hybridisierung und Immunhistochemie zeigen, dass ER α sowie die entsprechende mRNA überwiegend von Purkinjezellen aller Altersklassen exprimiert wurden. Im adulten Cerebellum wurden jedoch nur wenige ER α immunreaktive Purkinjezellen gefunden. Die ER α Expression erhöhte sich jedoch vorübergehend während des Wachstums der Purkinjezeldendriten und der Synapsenbildung, sodass besonders ER α bedeutend für die Differenzierung von Purkinjezellen zu sein scheint (Ikeda et al. 2006.) Dieser Befund korreliert auch mit unseren Beobachtungen: So zeigten sich in fortgeschrittenen Wachstumsstadien deutlich weniger gefärbte Purkinjezellen. Ab dem 15. postnatalen Entwicklungstag fiel die Anzahl SHBG-positiver Purkinjezellen deutlich, bis nach zwei Wochen fast alle Purkinjezellen SHBG-negativ waren. Somit scheint die Aktivität des Bindungsglobulins und auch des zugehörigen Sexualhormons dort deutlich zurück gegangen sein.

Mit Beginn der dritten Postnatalwoche zeigten sich erhöhte positive Immunaktivitäten v. a. im Bereich der Molekularschicht. Hier könnte die Hauptfunktion von SHBG in der neuronalen Differenzierung und Instandhaltung bzw. im erhöhten Transport von Sexualhormonen zu Beginn der Pubertät liegen. Desweiteren bekommt zu diesem Zeitpunkt das Muttertier in der Natur erneut Junge, woraufhin die Tiere aus dem Nest gejagt werden, was eine ausgereifte Entwicklung bezüglich der motorischen Koordination voraussetzt und sich demzufolge durch erhöhtes Vorkommen von SHBG im Stratum moleculare erklären könnte. Zu diesem Zeitpunkt sind das kortikale Gewebe und dessen Neurone ausgereift und die adulte Struktur des Kleinhirncortex der Ratte hat sich vollständig ausgebildet (Caley und Maxwell 1968).

Während die Bedeutung von SHBG und Östrogenen hinsichtlich gesteigerter Synaptogenese weitgehend bekannt ist, scheint die Funktion von SHBG bei Verhaltensvorgängen nach wie vor noch unbekannt zu sein. Untersuchungen konnten aber bereits darlegen, dass z. B. nach SHBG-Infusion in das mediale präoptische Areal und den medialen basalen Hypothalamus die Empfängnisbereitschaft von Ratten gesteigert werden konnte, was demzufolge auch auf eine Beeinflussung des Fortpflanzungsverhaltens hindeutet (Caldwell et al. 2000). Man geht davon aus, dass die geschlechtliche Differenzierung und die neuronale Kontrolle von

Reproduktionsvorgängen während einer zeitlich begrenzten und äußerst kritischen Periode des ZNS während dessen Differenzierung und Entwicklung von statten geht. Dies geschieht zu einem Zeitpunkt, in dem die Gewebe äußerst sensibel auf hormonelle Einflüsse reagieren. Bei Nagetieren scheint diese Periode der höchsten Steroidsensitivität perinatal zu sein und zieht sich in die frühe postnatale Entwicklungszeit. Während diesem wichtigen Zeitraum führen Androgene zur Maskulinisierung der männlichen Nagetiere, während bei neugeborenen weiblichen Tieren die Abwesenheit von testikulären Hormonen zur Entwicklung weiblichen Verhaltens führt (Toran-Allerand 1978). SHBG könnte somit auch entscheidenden Einfluss auf die sexuelle Differenzierung während der frühen Postnatalzeit nehmen. Auch Nguon et. al. 2005 nahmen an, dass geschlechtsabhängige Unterschiede in Struktur und Funktion des männlichen und weiblichen Kleinhirns mit der spezifischen Entwicklung des Cerebellums und der geschlechtsspezifischen Verteilung von Steroidrezeptoren mit der lokalen Synthese trophischer Faktoren und der Reifung der Hypophysenaxe zusammenhängen könnten. Viele neuropsychiatrische Erkrankungen zeigen ebenfalls ein geschlechtsabhängiges Auftreten und dahingehend könnte SHBG auch in Zukunft vielleicht bei der Behandlung dieser Erkrankungen eine wichtige Rolle spielen (Abel et al. 2011, Nguon et al. 2005).

Wenngleich sich die neuronale Verteilung von SHBG innerhalb der ersten 30 Tage verändert, so ist doch durchgehend in diversen neuronalen Zellen SHBG nachweisbar.

Die starke Expression von Bindungsglobulinen wie SHBG und auch z. B. CBG in sehr frühen Entwicklungsphasen des Cerebellums lässt vermutlich auch auf eine direkte Wirkung als trophischer Faktor schließen. Viele Gehirnregionen bzw. Nervenzelltypen besitzen spezifische trophische Wachstumsfaktoren, welche für die Entstehung eines neuronalen Netzwerkes und für den Funktionserhalt und das Überleben der Zellen von essentieller Bedeutung ist. Bei Nichtvorhandensein dieser Wachstumsfaktoren kommt es zu fehlender Synapsenbildung und zur Apoptose von Nervenzellen. Die von uns beobachteten Immunreaktivitäten werfen die Frage auf, ob SHBG tatsächlich als ein solcher trophischer Faktor der Kleinhirnentwicklung agiert, da es in den ersten vier Postnatalwochen in fast allen bedeutenden Neuronentypen des Cortex nachgewiesen werden konnte. Bereits Toran-Allerand (1996) zeigte, dass es zahlreiche Interaktionen des Estrogen-Rezeptor Komplexes mit Wachstumsfaktoren, einschließlich der Neurotrophine, gibt und diese für den Fortbestand neuronaler Verbindungen unabdingbar sind.

Besonders der Nervenwachstumsfaktor (NGF, nerve growth factor), 1950 von Rita Levi Montalcini entdeckt, nimmt großen Einfluss auf spezifische Neuronenpopulationen im ZNS.

SHBG könnte wie dieser ein stimulierender Faktor für das Neuritenwachstum sein und hat ebenso wie dieser zahlreiche Zielzellen sowohl im ZNS als auch in anderen Körpergeweben (Aloe 2011).

Die Wirkweise von Estrogen im ZNS kann daher nicht länger auf lediglich reproduktive Funktionen beschränkt werden. Die Identifikation weiterer Östrogen-Rezeptoren und die Darstellung der Konvergenz zwischen Estrogen und Wachstumsfaktor ähnlichen Signalübertragungswegen unterstreichen weiter die Komplexität der Wirkweise von Östrogenen und ihrer Bindungsglobuline im ZNS. Im sich entwickelnden Gehirn könnten Kreuzkuppungsreaktionen zwischen Östrogen und Neurotrophin nötig sein, um deren mannigfaltige Funktionen effizient auszulösen. Die Vermittlung von Östrogenfunktionen durch Interaktionen mit lokal synthetisierten Neurotrophinen, ihren Rezeptoren und ihren Signalkaskaden im Gehirn, könnte einen Mechanismus repräsentieren, durch den Östrogen, und damit auch SHBG, sowohl Einfluss auf lokale Kontrollmechanismen als auch auf die komplexe Gewebs- und Entwicklungsausprägung nehmen könnte (Toran-Allerand et al. 1999).

Zahlreiche Studien legten bereits die Koloalisation des Estrogenrezeptors mit Neurotrophin-Liganden und deren Rezeptorkomplexen in Neuronen des sich entwickelnden zentralen Nervensystems dar (Toran-Allerand et al. 1992, Miranda et al. 1993). Neurone in Estrogen-Zielorten (u. a. auch im Kleinhirncortex) kamen koloalisiert mit der mRNA für die Neurotrophine NGF und BDNF (brain derived neurotrophic factor) vor (Miranda et al. 1994). Diese Beobachtungen lassen ebenfalls vermuten, dass SHBG einen trophischen Faktor darstellt und damit weitreichend Einfluss auf die zelluläre und synaptische Organisation des Cerebellums während der Entwicklung nimmt. Besonders die Zellreplikation, die neuronale Differenzierung, Neuritenwachstum und Synapsenbildung finden während der ersten postnatalen Periode statt.

Die Kontrolle zelltypischer Spezifizierung im sich entwickelnden Kleinhirn auf molekularer Ebene sowie die genetischen Ursachen der meisten bekannten cerebellären Entwicklungsstörungen waren langezeit rätselhaft. Gendefekte, die zu kongenitalen Fehlentwicklungen des Kleinhirns (wie das Joubert Syndrom, das Dandy-Walker-Syndrom oder die pontozerebelläre Hypoplasie) führen, konnten bereits nachgewiesen werden (Millen und Gleeson 2008). Inwiefern sich nun die Abwesenheit von Bindungsglobulinen und deren zugehörigen Sexualhormonen auf die physiologische Kleinhirnentwicklung auswirkt und ob dies eventuell zu einer unphysiologischen Kleinhirnentwicklung führen könnte, sollte unbedingt weiter erforscht werden. Versuche mit CBG-knockout-Mäusen, bei denen es zu signifikanten

Beeinträchtigungen der regelrechten Entwicklung des Kleinhirns kam, lassen eine ähnliche Auswirkung bei verminderten SHBG-Spiegeln vermuten (Richard et al. 2010). Experimente mit Zellkulturen aus Kleinhirnzellen könnten z. B. zeigen, inwiefern sich das Vorhandensein von SHBG wachstums- oder teilungsfördernd auswirkt.

Mit fortschreitender Reifung des Cerebellums verändern sich die SHBG Spiegel weiter. In der vierten Postnatalwoche beschränkt sich die Immunreaktivität vornehmlich auf Körnerzellen, einige Dendriten und Interneurone. Die Purkinjezellen sind fast vollständig immunnegativ. Die Entwicklung der Motorik, der neuronalen Kreisläufe und der Kleinhirnmorphologie scheint mit Ende der vierten Entwicklungswoche und dem Erwachsenwerden der Tiere fast abgeschlossen zu sein. Dies äußert sich in verringerten SHBG-Spiegeln, die aber wahrscheinlich aufgrund beginnender Gonadenreifung nachweisbar bleiben. Die Geschlechtsreife bei Ratten beginnt zwischen dem 30. und 50., die Empfängnisbereitschaft zwischen dem 32. und 35. Entwicklungstag. Ob sich die SHBG Spiegel bei vollständiger geschlechtlicher Entwicklung noch einmal erhöhen, ist noch nicht untersucht. Wie sich die Immunreaktivitäten im höheren Alter entwickeln, war aber in den letzten Jahren Gegenstand einiger Studien. Womöglich übernimmt SHBG auch eine Rolle beim physiologischen Alterungsprozess und fungiert dort als Modulator (Caldwell und Jirikowski, 2009). Sexualhormonen wurde u. a. eine neuroprotektive Wirkung zugeschrieben und Untersuchungen bestätigten sinkende Spiegel im Alter, welche alters-assoziierter neuronaler Degeneration zu Grunde liegen könnten (Janmaat et al. 2011). Um neurogenerative Erkrankungen besser behandeln und evtl. sogar heilen zu können, widmete sich die Forschung auch der Herstellung von Alternativen zu herkömmlichen Östrogentherapien, da immer noch Ungewissheit bezüglich der exakten Wirkungen und Nebenwirkungen von Östrogenen in Gehirn besteht. Die Entwicklung sogenannter NeuroSERM's (Selective Estrogen Receptor Modulators) könnte dahingehend Fortschritte bringen. Diese könnten in der Lage sein, innerhalb des Gehirns zelluläre, biochemische und genomische Östrogenmechanismen zu aktivieren, aber gleichzeitig die Anregung peripherer Östrogenrezeptoren (insbesondere in Reproduktionsorganen lokalisierter) vermeiden, so äußerst gezielt wirken und zahlreiche unerwünschte Nebenwirkungen umgehen, z. B. Hitzewallungen oder Schlafstörungen während des Klimakteriums (Zhao et al. 2005). Zusammenhänge scheint es auch zwischen pathologischen Stoffwechselerkrankungen und der Höhe des SHBG-Spiegels zu geben. Erniedrigte SHBG-Werte sind u. a. ein Risikofaktor für das metabolische Syndrom (Chubb et al. 2008). Weitere Untersuchungen zeigten, dass sich die SHBG-Spiegel umgekehrt proportional zu Werten von Nüchtern glukose, Insulin, Triglyceriden und proportional zu HDL-Werten verhielten. Hohe

SHBG-Spiegel scheinen demnach mit gesundheitsfördernden Blutwerten einherzugehen (Lewis et al. 2010). Andere alters-assoziierte Erkrankungen, die von SHBG beeinflusst werden, sind z. B. Osteoporose, Alzheimer und Brustkrebs. Ensrud et al. (2006) fanden heraus, dass Gewichtsverluste bei älteren Männern, korrelierend mit einer abnehmenden Knochendichte an der Hüfte, durch einen Mangel an Sexualhormonen beeinflusst wird. Ein Einsatz von SHBG in der Tumorthherapie könnte in absehbarer Zeit ebenfalls realistisch sein. Östrogene haben auf Entwicklung und Wachstum von geschlechtshormonabhängigen Tumoren, wie z. B. dem Ovarial- oder Mammakarzinom, einen großen Einfluss (Misao et al. 1997). Von großem Interesse für die potentielle klinische Anwendung von SHBG war daher die Beobachtung, dass es in Östrogen-abhängigen Brustkrebszellen über seinen Rezeptor und second messenger die östradiol-induzierte Zellproliferation zu hemmen scheint (Fortunati 1999). Humane Brustkrebszellen vom Typ MCF-7 binden SHBG über einen lokalen Rezeptor. Die Bindung erfolgt spezifisch, zeitabhängig und mit hoher Affinität. Die Studie deutete darauf hin, dass die Interaktion von SHBG mit seinem Rezeptor auf MCF-7 Zellen zwar keinen Einfluss auf die Aufnahme von Östradiol in die Zelle nimmt, aber dass es die Wirkungen von Östradiol auf seine Zielzelle beeinflussen und regulieren kann. So reduzierte der an seinen Rezeptor gebundene SHBG-Hormon-Komplex signifikant die Östradiol-induzierte Zellproliferation in Tumoren (Fortunati et al. 1993).

Andere Forschungsergebnisse gaben Anhalt zur Überlegung, dass bei Gabe von Nervenwachstumsfaktoren durch Aussprossen von neuen Nervenzellen eine Therapie der Paraplegie möglich wäre.

Die Möglichkeiten einer potentiellen klinischen Anwendung von SHBG und von Sexualhormonen bei der Therapie zahlreicher Krankheiten scheinen immer noch viel weitreichender zu sein als bis dato angenommen. Das große Vorkommen von SHBG nicht nur im ZNS, sondern im gesamten menschlichen Organismus, lässt viel Raum und Spekulationen für weitere interessante Funktionsweisen.

Trotz langjähriger Forschungen ist die vollständige Wirkweise und Bedeutung von SHBG immer noch schwer zu fassen. Die vielfältigen Produktionsorte nicht nur in geschlechtsspezifischen Geweben wie Plazenta, Endometrium, etc., sondern auch seine starke Expression in großen Teilen des ZNS deuten auf eine noch komplexere und weitreichendere Funktionsvielfalt hin, als bis dato angenommen. Die Veränderungen des Kleinhirns spiegeln sich auch in der Expression von SHBG wieder. Die von uns beobachteten Immunreaktivitäten des Bindungsglobulins in der frühen postnatalen Entwicklungsperiode im Cerebellum weisen u. a. auf eine Rolle als Modulator während entwicklungsspezifischer Wachstumsstadien hin. SHBG regelt durch den Transport von Steroidhormonen ins Gehirn deren biologische Verfügbarkeit und somit das Ausmaß ihrer biologischen Wirkungen. Es scheint auch maßgeblich an der Ausprägung neuronaler Netzwerke und der Reifung diverser Neuronenarten beteiligt zu sein. Seine Lokalisation im Cerebellum in unterschiedlichen Regionen während unterschiedlicher Reifungsstadien legt verschiedene Aufgaben nahe.

SHBG konnte in diversen Neuronenarten des Kleinhirns der Ratte vom 1.- 32. Postnataltag nachgewiesen werden, wobei seine Expression einer enormen Dynamik unterworfen war. Insbesondere in der frühen Postnatalzeit war die Immunaktivität des Globulins sehr hoch, was zum einen auf den erhöhten Sexualhormonspiegel in der Milch des Muttertieres zurückzuführen sein könnte. Zum anderen spricht das aber auch für eine Rolle als Modulator während der Entwicklung der cerebellaren Verschaltungen. Während SHBG früher hauptsächlich als Transportprotein galt, scheint es auch als eigenständiges Hormon, Neurotransmitter oder als trophischer Faktor wirken zu können (Joseph 1994). Es ist nicht nur für den intrazellulären Transport von Sexualhormonen zuständig, sondern beeinflusst augenscheinlich die zelluläre und strukturelle Reifung des Kortex. Mit Beginn der Geschlechtsreife und der vollständigen adulten neuronalen und anatomischen Entwicklung sinken auch die SHBG-Spiegel. Neurosteroiden scheinen maßgeblich für die Plastizität und die zelluläre Entwicklung des Cerebellums verantwortlich zu sein. Die weitreichenden Wirkmechanismen der Neurosteroiden könnten aber ebenso bei der Therapie zahlreicher Erkrankungen Bedeutung erlangen, da viele neurodegenerative, alters- und Stoffwechsel-assoziierte Pathologien eine Abhängigkeit von Sexualhormonen wie Estrogenen und deren Bindungsglobulinen zeigen. Erkrankungen wie Alzheimer, Osteoporose, Diabetes,

geschlechtsabhängige Fehlfunktionen oder sogar Tumorleiden könnten durch gezielten Einsatz von SHBG oder auch z. B. durch Östrogen-Alternativen wie NeuroSerm's behandelt und geheilt werden.

Die verschiedenen Lokalisationen im gesamten menschlichen Organismus und seine komplexen Wirkgefüge mit Steroiden lassen auf noch weitere bedeutende Funktionen hoffen.

- Abel JM, Witt DM, Rissman EF. 2011. Sex differences in the cerebellum and frontal cortex: Roles of estrogen receptor alpha and sex chromosome genes. *Neuroendocrinology*, 93(4):230-40.
- Adams JS. 2005. "Bound" to work: The free hormone hypothesis revisited. *Cell*, 122(5):657-9.
- Aloe L. 2011. Rita Levi-Montalcini and the discovery of NGF, the first nerve cell growth factor. *Archives Italiennes de Biologie*, 149:175-181.
- Altman J, Bayer SA. 1978. Prenatal development of the cerebellar system in the rat I. Cytogenesis and histogenesis of the deep nuclei and the cortex of the cerebellum. *J Comp Neur*, 179:23-48.
- Altman J, Bayer SA. 1985. Embryonic development of the rat cerebellum III. Regional differences in the time of origin, migration and settling of purkinje cells. *J Comp Neurol*, 231:42–65.
- Altman J, Bayer SA. 1997. Development of the cerebellar system: In relation to its evolution, structure and function. Boca Raton USA. CRC Press.
- Avvakumov GV, Zhuk NI, Strel'chyonok OA. 1986. Subcellar distribution and selectivity of the protein-binding component of the recognition system for sex hormone-binding protein-estradiol complex in human decidual endometrium. *Biochimica et Biophysica Acta*, 881:489-498.
- Avvakumov GV. 1991. Membrane recognition of steroid-glycoprotein complexes: A model for steroid delivery to the target cells. In Gabius H.-J. und Gabius, *Lectins and Cancer*. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, pp 263-272.

- Avvakumov GV, Cherkasov A, Muller YA, Hammond GL. 2010. Structural analyses of sex hormone-binding globulin reveal novel ligands and function. *Mol Cell Endocrinol*, 316(1):13-23.
- Barinaga M. 1996. The Cerebellum: Movement coordinator or much more? *Science*, 272:482-83.
- Beato M, Chavez S, Truss M. 1996. Transcriptional regulation by steroid hormones. *Steroids*, 61(4):240-51.
- Becchis M, Sullivan PM, Ordronneau P, Petrusz P, Joseph DR. 1996. Distribution of immunoreactive androgen-binding protein /sex hormone-binding globulin in tissues of the fetal rat. *Steroids*, 61(7):392-400.
- Bellamy TC. 2006. Interactions between purkinje neurones and bergmann glia. *The Cerebellum*, 5:116-126.
- Bérubé D, Séralini GE, Gagné R, Hammond GL. 1990. Localization of the human sex hormone-binding globulin gene (SHBG) to the short arm of chromosome 17 (17p12-p13). *Cytogenet Cell Genet*, 54(1-2):65-7.
- Bower JM, Parsons LM. 2003. Rethinking the “lesser brain”. *Scientific American*. 08:51-57.
- Breedlove SM, Hampson E. 2002. Sexual differentiation of the brain and behavior. In: Becker JB, Breedlove AM, Crews D, Carthy MM, editors. *Behavioral endocrinology*. 2. Auflage. Cambridge (MA): Massachusetts Institute of Technology Press. p. 39-74.
- Caley DW, Maxwell DS. 1968. An electron microscopic study of neurons during postnatal development of the rat cerebral cortex. *Journal of Comparative Neurology*, 133(1):17-43.
- Caldwell JD, Moe BD, Hoang J, Nguyen T. 2000. Sex hormone-binding globulin stimulates female sexual receptivity. *Brain Res*, 874:24-29.

- Caldwell JD, Shapiro RA, Jirikowski GF, Suleman F. 2007. Internalization of sex hormone-binding globulin into neurons and brain cells in vitro and in vivo. *Neuroendocrinology*, 86(2):84-93.
- Caldwell JD, Jirikowski GF. 2009. Sex hormone-binding globulin and aging. *Horm Metab Res*, 41(3):173-82.
- Chubb SA, Hyde Z, Almeida OP, Flicker L, Norman PE, Jamrozik K, Hankey GJ, Yeap BB. 2008. Lower sex hormone-binding globulin is more strongly associated with metabolic syndrome than lower total testosterone in older men: the health in men study. *Eur J Endocrinol*, 158(6):785-92.
- Cooke B, Hegstrom CD, Villeneuve LS, Breedlove SM. 1998. Sexual differentiation of the vertebrate brain: principles and mechanisms. *Front Neuroendocrinol*, 19:323-362.
- Dean SL, McCarthy MM. 2008. Steroids, sex and the cerebellar cortex: Implications for human disease. *Cerebellum*, 7(1):38-47.
- Ensrud KE, Lewis CE, Lambert LC, Taylor BC, Fink HA, Barrett-Connor E, Cauley JA, Stefanick ML, Orwoll E. 2006. Endogenous sex steroids, weight change and rates of hip bone loss in older men: The MrOS study. *Osteoporos Int*, 17(9):1329-36.
- Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M. 2000. Multiple actions of steroid hormones. A focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev*, 52:513-555.
- Fan X, Xu H, Warner M, Gustafsson JA. 2008. ERbeta in CNS: New roles in development and function. *Cerebellum*, 7(3):501-2.
- Forges T, Gérard A, Monnier-Barbarino P, Gérard H. 2005. Immunolocalization of sex hormone-binding globulin (SHBG) in human ovarian follicles and corpus luteum. *Histochem Cell Biol*, 124(3-4):285-90.

- Fortunati N, Fissore F, Fazzari A, Berta L, Benedusi-Pagliano E, Frairia R. 1993. Biological relevance of the interaction between sex steroid-binding protein and its specific receptor of MCF-7 cells: effect on the estradiol-induced cell proliferation. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 45:435-444.
- Fortunati N. 1999. Sex hormone-binding globulin: Not only a transport protein. What news is around the corner? *J Endocrinol Invest*, (3):223-34.
- French FS, Ritzen EM. 1973. A high-affinity androgen-binding protein (ABP) in rat testis: evidence for secretion into efferent duct fluid and absorption by epididymis. *Endocrinology*, 93:88-95.
- Friedman WJ, McEwen BS, Toran-Allerand CD, Gerlach JL. 1983. Perinatal development of hypothalamic and cortical estrogen receptors in mouse brain: Methodological aspects. *Brain Res*, 11:19-27.
- Galea LA, Spritzer MD, Barker JM, Pawluski JL. 2006. Gonadal hormone modulation of hippocampal neurogenesis in the adult. *Hippocampus*, 16:225-232.
- Gerlach JL, McEwen BS, Toran-Allerand CD, Friedman WJ. 1983. Perinatal development of estrogen receptors in mouse brain accessed by radioautography, nuclear isolation and receptor assay. *Brain Res*, 11:7-18.
- Gershagen S, Fernlund P, Lundwall A. 1987. A cDNA coding for human sex hormone-binding globulin homology to vitamin K-dependent protein S. Elsevier Science Publishers BV, 220(1):129-135.
- Gershagen S, Lundwall A, Fernlund P. 1989. Characterization of human sex hormone-binding globulin (SHBG) gene and demonstration of two transcripts in both liver and testis. *Nucleic Acids Res*, 17(22):9245-9257.
- Goldowitz D, Hamre K. 1998. The cells and molecules that make a cerebellum. *Trends Neurosci*, 21:375-382.

Greenspan FS, Basic and Clinical Endocrinology, Third Edition, 1992.

Griffin PR, Kumar S, Shabanowitz J, Charbonneau H, Namkung PC, Walsh KA, Hunt DF, Petra PH. 1989. The amino acid sequence of the sex steroid-binding protein of rabbit serum. *J Biol Chem*, 264(32):19066-19075.

Grishkovskaya I, Avvakumov GV, Sklenar G, Dales D, Hammond GL, Muller YA. 2000. Crystal structure of human sex hormone-binding globulin: steroid transport by a laminin G-like domain. *The EMBO Journal*, 19(4):504-512.

Hammond, GL, Underhill DA., Smith CL, Goping IS., Harley MJ, Musto NA, Cheng CY, Bardin CW. 1987. The cDNA-deduced primary structure of human sex hormone-binding globulin and location of its steroid-binding domain. *FEBS Lett*, 215:100-104.

Hammond GL. 1990. Molecular properties of corticosteroid binding globulin and the sexsteroid binding proteins. *Endocrine Rev*, 11(1):65-79.

Haraguchi S, Sasahara K, Shikimi H, Honda SI, Harada N, Tsutsui K. 2011. Estradiol promotes purkinje dendritic growth, spinogenesis and synaptogenesis during neonatal life by inducing the expression of BDNF. *Neuroendocrinology*, 93(4):230-40.

Herbert Z, Göthe S, Caldwell JD, Petrusz P, Peuckert P, Jirikowski GF. 2005. Identification of sex hormone-binding globulin in the human hypothalamus. *Neuroendocrinol*, 81:287-293.

Herbert Z, Jirikowski GF, Petrusz P, Englof I, Caldwell JD. 2003. Distribution of androgen binding globulin in the rat hypothalamo-hypophysial system, co-localization with oxytocin. *Brain Res*, 992:151-158.

Hogeveen KN, Cousin P, Pugeat M, Dewailly D, Soudan B, Hammond GL. 2002. Human sex hormone-binding globulin variants associated with hyperandrogenism and ovarian dysfunction. *J Clin Invest*, 109:973-981.

- Hryb DJ, Khan MS, Romas NA, Rosner W. 1990. The control of the interaction of sex hormone-binding globulin with its receptor by steroid hormones. *J Biol Chem*, 265(1):6048-6054.
- Hryb DJ, Nakhla AM, Kahn SM, St George J, Levy NC, Romas NA, Rosner W. 2002. Sex hormone-binding globulin in the human prostate is locally synthesized and may act as an autocrine/paracrine effector. *J Biol Chem*, 277:26618-26622.
- Ikeda Y, Nagai A. 2006. Differential expressions of the estrogen receptors alpha and beta during postnatal development of the rat cerebellum. *Brain Res*, 1083(1):39-49.
- Ito M 2006. Cerebellar circuitry as a neuronal machine. *Progress in Neurobiology*, 78:(1-3)272-303.
- Janmaat S, Akwa Y, Doulazmi M, Bakouche J, Gautheron V, Liere P, Eychenne B, Pianos A, Luiten P, Groothuis T, Baulieu EE, Mariani J, Sherrard RM, Frédéric F. 2011. Age-related purkinje cell death is steroid dependent: ROR α haplo-insufficiency impairs plasma and cerebellar steroids and Purkinje cell survival. *Age (Dordr)*, 33(4):565-78.
- Jänne M, Hogeveen KN, Deol HK, Hammond GL. 1990. Expression and regulation of human sex hormone-binding globulin transgenes in mice during development. *Endocrinology*, 140(9):4166-4174.
- Jänne M, Deol HK, Power S, Yee SP, Hammond GL. 1998. Human sex hormone-binding globulin gene expression in transgenic mice. *Mol Endocrinol*, 12:123-136.
- Joseph DR, Baker ME. 1992. Sex hormone-binding globulin, androgen-binding protein and vitamin K-dependent protein S are homologous to laminin A, merosin and drosophila crumbs protein. *FASEB J*, 6(7):2477-2481.
- Kahn SM, Hryb DJ, Nakhla AM, Romas NA, Rosner W. 2002. Sex hormone-binding globulin is synthesized in target cells. *J Endocrinol*, 175(1):113-120.

- Koibuchi N. 2008. Hormonal regulation of cerebellar development and plasticity. *Cerebellum*, 7(1):1-3.
- Konnerth A, Lanot I, Armstrong CM. 1990. Synaptic currents in cerebellar purkinje cells. *Neurobiology*, 87:2662-2665.
- Lewis JG, Borowski KK, Shand BI, George PM, Scott RS. 2010. Plasma sex hormone-binding globulin, corticosteroid-binding globulin, cortisol, and free cortisol levels in outpatients attending a lipid disorders clinic: A cross-sectional study of 1137 subjects. *Horm Metab Res*, 42(4):274-9.
- Lippert H. 2000, *Lehrbuch Anatomie*, Urban&Fischer, 5. Auflage, S.482-486.
- Königshoff M, Brandenburger T. 2004. *Kurzlehrbuch Biochemie*, Thieme Verlag, 2. Auflage, S.195-214.
- McCarty KS JR, McCarty KS. 1977. Steroid hormone receptors in the regulation of differentiation. *American Journal of Pathology*, 86(3):703-745.
- McEwen BS. 1994. Steroid hormone actions on the brain: When is the genome involved? *Hormones and Behavior*, 28:396-405.
- McEwen BS. 2001. *Genome and Hormones: Gender differences in physiology*.
Invited Review: Estrogens effects on the brain: Multiple sites and molecular mechanisms. *J Appl Physiol* 91: 2785-280.
- McLusky NJ, Hajszan T, Prange-Kiel J, Leranth C. 2006. Androgen modulation of hippocampal synaptic plasticity. *Neuroscience*, 138:957-965.
- Mainwaring WIP. 1975. Steroid hormone receptors: A survey. *Vitam Horm*, 33:223-245.
- Mendel CM. 1992. The free hormone hypothesis. Distinction from the free hormone transport hypothesis. *J. Androl*, 13:107-116.

- Millen KJ, Gleeson JG. 2008. Cerebellar development and disease. *Curr Opin Neurobiol*, 18(1):12-9.
- Miranda R, Sohrabji F, Toran-Allerand CD. 1993. Neuronal colocalization of mRNAs for neurotrophins and their receptors in the developing central nervous system suggests a potential for autocrine interactions. *Proc Natl Acad Sci*, 90:6439-6443.
- Miranda R, Sohrabji F, Toran-Allerand CD. 1994. Interactions with the neurotrophins and their receptors during neural development. *Horm and Beh*, 28:367-375.
- Misao R, Nakanishi Y, Fujimoto J, Tamaya T. 1997. Expression of sex hormone-binding globulin Exon VII splicing variant messenger RNA in human uterine endometrial cancers. *Cancer Research*, 57:5579-5583.
- Nakhla AM, Leonard J, Hryb DJ, Rosner W. 1999. Sex hormone-binding globulin receptor signal transduction proceeds via a G protein. *Steroids*, 64(3):213-6.
- Neufang S, Specht K, Hausmann M, Güntürkün O, Herpertz-Dahlmann B, Fink G, Konrad K. 2009. Sex differences and the impact of steroid hormones on the developing human brain. *Cerebral Cortex*, 19:464-473.
- Nguon K, Ladd B, Baxter MG, Sajdel-Sulkowska EM. 2005. Sexual dimorphism in cerebellar structure, function, and response to environmental perturbations. *Prog Brain Res*, 148:341-51.
- O'Malley B. 1990. The steroid receptor superfamily: More excitement predicted for the future. *Mol Endocrinol*, 4(3):363-9.
- Pardridge WM, Mietus LJ. 1979. Transport of steroid hormones through the rat blood-brain barrier. *J Clin Invest*, 64:145-154.
- Parnavelas J. 2000. The origin and migration of cortical neurones: New vistas. *Trends Neurosci*, 23:126-131.

- Porto CS, Lazari MF, Abreu LC, Bardin CW, Gunsalus GL. 1995. Receptors for androgen-binding proteins: internalization and intracellular signaling.
J Steroid Biochem Mol Biol, 53:561-565.
- Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R. 2006.
Biochemie, Thieme Verlag, 1. Auflage, S.593f.
- Rees S, Loeliger M, Shields A, Shaul PW, McCurnin D, Yoder B, Inder T. 2010. The effects of postnatal estrogen therapy on brain development in preterm baboons.
Prog Brain Res, 181:233-50.
- Revelli A, Massobrio M, Tesarik J. 1998. Nongenomic actions of steroid hormones in reproductive tissues. Endocr Rev, 19:3-17.
- Richard EM, Helbling J, Tridon C, Desmedt A, Minni AM, Cador M, Pourtau L, Konsman JP, Mormède P, Moisan MP. 2010. Plasma transcortin influences endocrine and behavioral stress responses in mice. Endocrinol, 151:649-659.
- Romeo RD, Richardson HN, Sisk CL. 2002. Puberty and the maturation of the male brain and sexual behavior: recasting a behavioral potential.
Neurosci Biobehav Rev, 26:381-391.
- Rosner W. 1990. The functions of corticosteroid-binding globulin and sex hormone-binding globulin: Recent advances. Endocrine Rev, 11(1):80-91.
- Rosner W. 1991. Plasma steroid-binding proteins.
Endocrinol Metab Clin North Am, 20(4):697-720.
- Rosner W, Hryb DJ, Khan MS, Nahkla AM, Romas NA. 1992. Sex hormone-binding globulin. Binding to cell membranes and generation of a second messenger.
J Androl, 13:101-106.
- Schmahmann JD. 1997. The cerebellum and cognition.
Associated Press, International Review of Neurobiology, (41): xxvii-8.

- Schock HW, Herbert Z, Sigusch H, Figulla HR, Jirikowski GF, Lotze U. 2006. Expression of androgen-binding protein (ABP) in human cardiac myocytes. *Hormones and Metabolic Research*, 38:225-229.
- Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K. 2006. Prometheus: Kopf und Neuroanatomie. Thieme Verlag, S.238-245.
- Sendemir E, Herbert Z, Caldwell JD, Jirikowski GF. 2006. Changes of sex hormone-binding globulin/SHBG, Expression in the hypothalamo-hypophyseal system of rats during pregnancy, parturition and lactation. *Horm Metab Res*, 38:219-224.
- Standring S. 2004. Grey's Anatomy, Elsevier Churchill Livingstone, 39. Auflage, S.258-260.
- Strel'chyonok OA, Avvakumov GV, Survilo LI. 1984. A recognition system for sex hormone-binding protein-estradiol complex in human decidual endometrium plasma membranes. *Biochim Biophys Acta*, 802(3):459-66.
- Sullivan PM, Wang YM, Joseph DT. 1993. Identification of an alternate promoter in the rat androgen-binding protein/sex hormone-binding globulin gene that regulates synthesis of a messenger RNA encoding a protein with altered function. *Mol Endocrin*, 7:702-715.
- ten Donkelaar HJ, Lammens M, Wesseling P, Thijssen HO, Renier WO. 2003. Development and developmental disorders of the human cerebellum. *J Neurol*, 250(9):1025-36.
- Toran-Allerand CD. 1978. Gonadal Hormones and Brain Development: Cellular aspects of sexual differentiation. *Amer. Zool*, 18 (3): 553-565.
- Toran-Allerand CD, Miranda R, Bentham W, Sohrabji F, Brown T, Hochberg R, MacLusky N. 1992. Estrogen receptors colocalize with low-affinity nerve growth factor receptors in cholinergic neurons of the basal forebrain. *Proc Natl Acad Sci*, 89:4668-4672.

- Toran-Allerand CD. 1996. The estrogen/neurotrophin connection during neural development: Is co-localization of estrogen receptors with the neurotrophins and their receptors biologically relevant? *Dev Neurosci*, 18:36-48.
- Toran-Allerand CD, Singh M, Sétáló Jr G. 1999. Novel mechanisms of estrogen action in the brain: New players in an old story. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 20:97-121.
- Trepel M. 2004. *Neuroanatomie: Struktur und Funktion*. Elsevier München: Urban&Fischer, 3. Auflage, S.149-155.
- Voogd J, Glickstein M. 1998. The anatomy of the cerebellum. *Trends Neurosci*, 21:370-375.
- Wang YM, Bayliss DA, Millhorn DE, Petrusz P, Joseph DR. 1990. The androgen-binding protein gene is expressed in male and female rat brain. *Endocrinology*, 127:3124-3130.
- Wang YM, Zoghbi HY. 2001. Genetic regulation of cerebellar development. *Nature Reviews Neuroscience*, 2:484-491.
- Welsch 2006. *Lehrbuch Histologie*. Elsevier München: Urban&Fischer, 2. Auflage, S. 624-628.
- Whiting KP, Restall CJ, Brain PF. 2000. Steroid hormone-induced effects on membrane fluidity and their potential roles in non-genomic mechanisms. *Life Sciences*, 67:743-757.
- Zhao L, O'Neill K, Diaz Brinton R. 2005. Selective estrogen receptor modulators (SERMs) for the brain: Current status and remaining challenges for developing NeuroSERMs. *Brain Res Rev*, 49(3):472-93.

| | |
|----------------|---|
| Abb. 01 | Außenansicht des Kleinhirns des Menschen |
| Abb. 02 | Kleinhirnrinde, Silberfärbung |
| Abb. 03 | Aufbau des Cortex mit Afferenzen, Efferenzen und Neuronentypen |
| Abb. 04 | Proteinstruktur des humanen SHBG |
| Abb. 05 | Übersichtstabelle der untersuchten Entwicklungstage |
| Abb. 06 | Gewebeblöcke in EPON 812 |
| Abb. 07 | Herstellung der Semi-Dünnschnitte am Ultracut S |
| Abb. 08 | Übersichtsfärbung Kleinhirnrinde, 1. PNT |
| Abb. 09 | Übersichtsfärbung Kleinhirnrinde, 1. PNT |
| Abb. 10 | Übersichtsfärbung Kleinhirnrinde, 2. PNT |
| Abb. 11 | SHBG positive Purkinjezellendriten, 1. PNT |
| Abb. 12 | SHBG positive Körnerzellen, 3. PNT |
| Abb. 13 | SHBG positive Purkinjezellen unter Aussparung der Nucleoli, 5. PNT |
| Abb. 14 | SHBG positives Interneuron, 5. PNT |
| Abb. 15 | SHBG positive Neurone im Stratum purkinjense, 9. PNT |
| Abb. 16 | Übersichtsfärbung Kleinhirnrinde, 9. PNT |
| Abb. 17 | SHBG positive Purkinjezellen, 11. PNT |
| Abb. 18 | Übersichtsfärbung Kleinhirnrinde, 11. PNT |
| Abb. 19 | SHBG positive Körnerzellen im Stratum granulosum, 13. PNT |
| Abb. 20 | SHBG positive Neurone im Stratum moleculare, 14. PNT |
| Abb. 21 | SHBG positive Neurone im Stratum moleculare, 14. PNT |
| Abb. 22 | Übersichtsfärbung Kleinhirnrinde, 16. PNT |
| Abb. 23 | schwach SHBG positive Purkinjezellen in der Molekularschicht, 16. PNT |
| Abb. 24 | SHBG positive Neurone in der Molekularschicht, 16. PNT |
| Abb. 25 | SHBG positive Purkinjezellen, zytoplasmatisch und nukleär (1), nukleär gefärbt (2), 18. PNT |
| Abb. 26 | Übersichtsfärbung Kleinhirnrinde, 18. PNT |
| Abb. 27 | SHBG positive Neurone in der Umgebung der Purkinjezellen, 20. PNT |
| Abb. 28 | vereinzelte SHBG positive Körnerzellen im Stratum granulosum, 22. PNT |
| Abb. 29 | Übersichtsfärbung Kleinhirnrinde, 22. PNT |

- Abb. 30** SHBG positive Neurone im Stratum moleculare (1)
SHBG negative Purkinjezellen (2)
SHBG positive Körnerzellen (3), 24. PNT
- Abb. 31** Übersichtsfärbung Kleinhirnrinde, 24. PNT
- Abb. 32** SHBG positive Interneurone, 26. PNT
- Abb. 33** SHBG positive Purkinjezeldendriten im Stratum moleculare (1)
SHBG negative Purkinjezellen (2)
SHBG positive Körnerzellen im Stratum granulare (3), 28. PNT
- Abb. 34** SHBG positive Interneurone im Stratum granulosum, 30. PNT
- Abb. 35** SHBG positive Interneurone im Stratum moleculare (1)
und im Stratum granulosum (3)
SHBG negative Purkinjezellen (2), 32. PNT
- Abb. 36** Übersichtsfärbung Kleinhirnrinde, 28. PNT

Tabellen

S. 37

Verteilungsmuster immunpositiver Neurone

Persönliche Daten

Name: Kristin Piontek
Geburtsdatum: 16.12.1986
Geburtsort: Karl-Marx-Stadt
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1993-1996 20. Grundschule am Waldpark, Dresden
1996-2003 Bertolt-Brecht-Gymnasium, Dresden
2003-2004 Salisbury High School, South Australia
2004-2006 Bertolt-Brecht-Gymnasium, Dresden

Universitäre Bildung

10/2006-12/2011 Studium der Zahnmedizin an der FSU-Jena
08/2007 naturwissenschaftliche Vorprüfung
03/2009 zahnärztliche Vorprüfung
08/2011-12/2011 Staatsexamen
01/2012 Approbation

Berufliche Tätigkeit

06/2012-11/2012 Zahnärztin (Vorbereitungsassistentin) in Zahnarztpraxis
in Potsdam
seit 12/2012 Zahnärztin (Vorbereitungsassistentin) in Zahnarztpraxis
in Brieselang

Potsdam,

Kristin Piontek

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. med. Gustav F. Jirikowski, OA Dr. Hartmut Oehring,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und das Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Potsdam,

Kristin Piontek

Besonders herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Gustav F. Jirikowski für die Möglichkeit bedanken, diese Dissertation am Institut für Anatomie II in Jena anfertigen zu können. Er hatte jederzeit für auftretende Fragen und Probleme ein offenes Ohr und stand mit kritischen und konstruktiven Anmerkungen bei der Planung und Anfertigung der vorliegenden Arbeit mit Rat und Tat zur Seite.

Desweiteren möchte ich auch Herrn OA Dr. Hartmut Oehring für zahlreiche fachliche Ratschläge und vor allem für die Hilfe bei der Auswertung der zahlreichen histologischen Präparate sehr herzlich danken.

Großer Dank geht auch an Frau Sabine Hitschke, Frau Alida Braunschweig sowie Herrn Dr. Wilfried Dölz, welche hinsichtlich der Bereitstellung aller labortechnischen Materialien sowie bei der Planung der Durchführung des experimentellen Teils eine wertvolle Stütze waren.

Meiner lieben Freundin, ehemaligen Kommilitonin und Kollegin, Stefanie Lippold, möchte ich ebenfalls für die gemeinsame Zeit im Labor und unzählige Telefonate von Herzen danken.

Auch allen anderen hier nicht genannten Personen, die mich während der Fertigstellung sowohl praktisch als auch emotional unterstützt haben, möchte ich meinen Dank ausdrücken.

Und nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, ohne deren Unterstützung während der letzten Jahre diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.